



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 37 105 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 197 37 105.1
㉔ Anmeldetag: 26. 8. 97
㉕ Offenlegungstag: 4. 3. 99

㉙ Int. Cl.⁶:
C 12 N 15/52
C 12 N 15/63
C 12 Q 1/34
C 07 K 16/40
A 61 K 38/46

DE 197 37 105 A 1

㉙ Anmelder:
BASF AG, 67063 Ludwigshafen, DE

㉙ Erfinder:
Dear, Neil T., Dr., 69123 Heidelberg, DE; Boehm,
Thomas, Prof. Dr., 79279 Vörsstetten, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

㉙ Neue gewebspezifische Calpaine, ihre Herstellung und Verwendung

㉙ Die Erfindung betrifft neue gewebspezifische Calpaine
und ihre Herstellung.
Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Screening
nach neuen Calpaininhibitoren und deren Verwendung.

DE 197 37 105 A 1

BEST AVAILABLE COPY

Die Erfindung betrifft neue gewebspezifische Calpaine und ihre Herstellung.

Weiterhin betrifft die Erfindung Verfahren zum Screening nach neuen Calpaininhibitoren und deren Verwendung.

- 5 Calpaine gehören zu den intrazellulären, nicht-lysosomalen Enzymen aus der Gruppe der Cystein-Proteasen. Sie sind an der Ca^{2+} -abhängigen Signaltransduktion in eukaryontischen Zellen beteiligt, d. h. sie regulieren abhängig von der Ca^{2+} Konzentration zelluläre Funktionen. Calpaine kommen ubiquitär in tierischen Geweben bzw. Zellen von beispielsweise Mensch, Hühnern, Kaninchen oder in der Ratte vor. Auch in niederen Tieren wie beispielsweise in *Drosophila melanogaster*, *Schistosoma* oder *Caenorhabditis elegans* wurden Calpaine gefunden. In Hefen, Pilzen oder Bakterien konnten bisher keine Calpaine nachgewiesen werden.

- 10 Bisher sind drei Hauptisoformen dieser ubiquitären Calpaine bekannt, die sich in vitro durch ihre Kalzium-abhängige Aktivierbarkeit unterscheiden. Calpain I (= μ Calpain) wird durch μ -molare Kalziumion-Konzentrationen aktiviert, während Calpain II (= mCalpain) erst durch millimolare Konzentrationen an Kalziumionen aktiviert wird. Beide Calpaine bestehen aus zwei Untereinheiten, einer großen Untereinheit mit ca. 80 kDa und einer kleinen Untereinheit von ca. 30 kDa. Beide Untereinheiten des aktiven Heterodimers besitzen Bindungsstellen für Kalzium. Die große Untereinheit wird aus folgenden vier Proteindomänen (= I-IV) aufgebaut: einer Proteasedomäne (= Domäne II), einer Kalzium-bindenden Domäne (= Domäne IV) und zwei weiteren Domänen (= Domäne I und III), deren Funktion unklar ist. Die kleine 30 K-
- 15 Untereinheit besteht aus einer Kalzium-bindenden Untereinheit (= IV) und einer weiteren Untereinheit (= V), deren Funktion unklar ist. Zusätzlich zu diesen beiden Calpaintypen wurde ein dritter bezüglich der Kalziumaktivierung intermediärer Typ (= μ /m 80K) im Huhn gefunden (Wang K.K.W. et al., *TIPS*, Vol. 15, 1994: 412-419, Suzuki, K et al., *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, Vol. 376, 1995: 523-529).

- Neben diesen ubiquitär vorkommenden Calpainen wurden in letzter Zeit zwei neue gewebespezifisch exprimierte Calpaine identifiziert. nCL-1 (= p94) ist ein in Hühnern, Ratten und Menschen vorkommendes, Muskel-spezifisches Calpain, das vermutlich als Monomer aktiv sein könnte und nur aus der 80 kd Untereinheit besteht. Neben nCL-1 gibt es ein Magen-spezifisches Calpain, das in zwei Splicing-Varianten nCL-2 und nCL-2' vorkommen kann. nCL-2' unterscheidet sich gegenüber nCL-2 durch das Fehlen der Kalzium-bindenden Region (Sorimachi, H.S. et al., *J. Biol. Chem.* Vol. 268, No. 26, 1993: 19476-19482, Sorimachi, H.S. et al., *FEBS Lett.* 343, 1994: 1-5). Auch in *Drosophila* wurde ein Calpain-homologes Protein (= CalpA), das mit Actin interagiert und vermutlich eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung spielt, gefunden, daß zwei verschiedene Splicing-Varianten aufweist (*Mol. Cell. Biol.* Vol. 15, No. 2, 1995: 824-834). Auch hier fehlt der kürzeren Variante die Kalziumbindestelle.

- Man vermutet, daß Calpaine bei verschiedenen physiologischen Prozessen eine wichtige Rollen spielen. Eine Vielzahl von cytoskeletalen, membrangebundenen oder regulatorischen Proteinen wie Proteinkinase C, Phospholipase C, Spectrin, Cytoskelett-Proteine wie MAP2, Muskelproteine, Neurofilamente und Neuropeptide, Plättchenproteine, "Epidermal Growth Factor"-, NMDA-Rezeptor und Proteine, die an der Mitose beteiligt sind, sowie weitere Proteine sind Calpainsubstrate (Barrett M.J. et al., *Life Sci.* 48, 1991: 1659-69, Wang K.K. et al., *Trends in Pharmacol. Sci.*, 15, 1994: 412-419). Die normale physiologische Funktion der Calpaine ist bis heute jedoch noch nicht klar verstanden. Sie sind bei einer Vielzahl von physiologischen Prozessen wie beispielsweise der Apoptose, der Zellteilung und -differenzierung oder an der Embryonalentwicklung beteiligt.

- Bei verschiedenen pathophysiologischen Prozessen und Krankheiten wurden erhöhte Calpain-Spiegel gemessen, zum Beispiel bei: Ischämien des Herzen (z. B. Herzinfarkt), der Niere oder des Zentralnervensystems (z. B. Hirnschlag), Entzündungen, Muskeldystrophien, Katarakten der Augen (Grauer Star), Verletzungen des Zentralnervensystems (z. B. Trauma), Alzheimer Krankheit, HIV-induzierte Neuropathy, Parkinsonsche- und Huntingtonsche Krankheit usw. (siehe Wang K.K. oben). Man vermutet einen Zusammenhang dieser Krankheiten mit einem erhöhten und anhaltenden intrazellulären Kalziumspiegel. Dadurch werden Kalzium-abhängige Prozesse überaktiviert und unterliegen nicht mehr der physiologischen Regelung. Dementsprechend kann eine Überaktivierung von Calpainen auch pathophysiologische Prozesse auslösen.

- Daher wurde postuliert, daß Inhibitoren der Calpain-Enzyme für die Behandlung dieser Krankheiten nützlich sein können. Verschiedene Untersuchungen bestätigten dies. So haben Seung-Chyul Hong et al. (*Stroke* 1994, 25 (3), 663-669) und Bartus R.T. et al. (*Neurological Res.* 1995, 17, 249-258) eine neuroprotektive Wirkung von Calpaininhibitoren bei akuten neurodegenerativen Störungen, wie sie nach Hirnschlag auftreten, gezeigt. Ebenso verbesserten nach experimentellen Gehirntraumata Calpaininhibitoren die Erholung der auftretenden Gedächtnisleistungsdefizite und neuromotorischen Störungen (Saatman K.E. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 1996: 3428-3433). Edelstein C.L. et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 1995, 7662-7666) fand eine protektive Wirkung von Calpaininhibitoren auf durch Hypoxie geschädigten Nieren. Yoshida K.I. et al. (*Jap. Circ. LT.* 59 (1), 1995, 40-48) konnten günstige Effekte von Calpaininhibitoren nach cardialen Schädigungen aufzeigen, die durch Ischämie oder Reperfusion erzeugt wurden. Da Calpaininhibitoren die Freisetzung von β -AP4-Protein hemmen, wurde eine potentielle Anwendung als "Therapeutikum der Alzheimer Krankheit" vorgeschlagen (Higaki LT. et al., *Neuron*, 14, 1995: 651-659). Die Freisetzung von Interleukin-1 α wird ebenfalls durch Calpaininhibitoren gehemmt (Watanabe N. et al., *Cytokine*, 6 (6), 1994: 597-601). Weiterhin wurde gefunden, daß Calpaininhibitoren cytotoxische Effekte an Tumorzellen zeigen (Shiba E. et al., 20th Meeting Int. Ass. Breast Cancer Res., Sendai Jp, 1994, 25.-28. Sept., *Int. J.T. Onco.* 5 (Suppl.), 1994, 381). Auch bei der Restenose und bei Arthritis spielt Calpain eine wichtige Rolle und Calpaininhibitoren können das Krankheitsbild positiv beeinflussen (March K.L. et al. *Circ. Res.* 72, 1993: 413-423, Suzuki K. et al., *Biochem LT.*, 285, 1992: 857-862).

Weitere mögliche Anwendungen von Calpaininhibitoren sind Wang K.K. (*Trends in Pharmacol. Sci.*, 15, 1994: 412-419) zu entnehmen.

- 65 Der potenteste und selektivste Calpaininhibitor ist das natürlich vorkommende intrazelluläre Protein Calpastatin. Es hemmt sowohl Calpain I als auch Calpain II, nicht jedoch andere Cystein- bzw. Thiolproteasen wie Cathepsin B, L oder Papain. Das aus ca. 700 Aminosäuren bestehende Calpastatin hat jedoch den Nachteil, daß es für therapeutische Möglichkeiten aufgrund der Größe und der Unpassierbarkeit der Zellmembran nicht in Frage kommt. Neben niedermoleku-

laren peptidischen Calpaininhibitoren wurden eine Reihe nicht-peptidischer Inhibitoren identifiziert. Nachteil dieser Inhibitoren ist, daß sie instabil sind, rasch metabolisiert werden und zum Teil toxisch sind. Viele Calpaininhibitoren zeichnen sich außerdem durch eine mangelnde Selektivität aus, d. h. sie hemmen nicht nur Calpain I und II sondern auch andere Cysteinproteasen wie Papain, Chymotrypsin, Elastase oder Cathepsin B und L.

Es besteht daher nach wie vor ein Bedarf nach selektiven, hoch wirksamen Calpaininhibitoren. Für das Screening nach diesen selektiven, gut wirksamen Calpaininhibitoren sind hochspezifische Testsysteme erforderlich, die es ermöglichen selektive Inhibitoren zu identifizieren. Üblicherweise werden die Screeningtests mit den ubiquitär vorkommenden Calpainen Calpain I und Calpain II durchgeführt.

Für das Auffinden selektiver Inhibitoren ist es notwendig und wünschenswert weitere Calpaine zur Verfügung zu stellen, die möglichst gewebespezifisch exprimiert werden, so daß die Inhibitoren auf ihre Selektivität zwischen den einzelnen Calpainen geprüft werden können.

Darüber hinaus sind weitere neue Calpaine gesuchte Proteine, da sie mit hoher Wahrscheinlichkeit bei den verschiedenen Krankheitsbildern bzw. Krankheiten unterschiedlich exprimiert werden und eine wichtige Rolle bei diesen Krankheiten spielen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, Mittel zur Profilierung und Identifizierung von Calpaininhibitoren zur Verfügung zu stellen, die es ermöglichen Calpaininhibitoren zu identifizieren, die einerseits nur gegenüber einem Calpain inhibierende Wirkung aufweisen, und/oder andererseits gegenüber mehreren Calpainen inhibierende Wirkung aufweisen und diese als therapeutisches Target zur Verfügung zu stellen.

Gegenstand der Erfindung ist ein neues gewebsspezifisches Calpaingen mit der Sequenz SEQ ID NO. 1 oder SEQ ID NO. 3 und der Bezeichnung CAPN6, seine allelischen Varianten, Analoge oder Derivate, die auf der abgeleiteten Aminosäureebene eine Homologie von 60 bis 100% aufweisen, wobei die Calpaingene, ihre allelischen Varianten, Analoge oder Derivate folgende Sequenzen enthalten:

(a) Leu-Gly-Asn-Lys-Ala,

wobei sich diese Sequenz von der entsprechenden Sequenz im humanen Calpain I dadurch unterscheidet, daß die Aminosäure Cystein im humanen Calpain I, die die Position 115 im Calpain I besitzt, gegen Lysin, das an Position 81 der Sequenzen SEQ ID No. 1 und SEQ ID No. 3 liegt, verändert ist;

(b) Ala-X-Ser-Cys-Leu-Ala,

wobei gegenüber der entsprechenden Sequenz im humanen Calpain I die Aminosäuren Alanin und Threonin in den Positionen 122 und 125 gegen Serin und Alanin in den Positionen 88 und 91 in den Sequenzen SEQ ID No. 1 und SEQ ID No. 3 verändert sind;

(c) Gly-Tyr-Thr-(His oder Tyr)-Thr-X-Thr,

wobei gegenüber der entsprechenden Sequenz im humanen Calpain I die Aminosäuren Histidin, Alanin und Serin in den Positionen 272, 273 und 275 gegen Tyrosin, Threonin und Threonin in den Positionen 252, 253 und 255 in den Sequenzen SEQ ID No. 1 und SEQ ID No. 3 verändert sind und in der SEQ ID No. 3 zusätzlich der Tyrosinrest in Position 274 im Calpain I gegen Histidin in Position 254 in der SEQ ID No. 3 verändert ist;

(d) Arg-X-Arg-Asn-Pro-Leu-Gly

wobei sich diese Sequenz von der entsprechenden Sequenz im humanen Calpain I dadurch unterscheidet, daß die Aminosäure Tryptophan im humanen Calpain I, die die Position 298 im Calpain I besitzt, gegen Leucin, das an Position 286 der Sequenzen SEQ ID No. 1 und SEQ ID No. 3 liegt, verändert ist und

X in den genannten Sequenzen eine beliebige natürliche Aminosäure bedeutet.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Identifizierung von Calpaininhibitoren, wobei man ein Calpain, seine allelischen Varianten oder Analoge codiert durch eine Sequenz gemäß Anspruch 1 aus Geweben oder Zellen isoliert und die Inhibierung der Spaltung eines Substrats des Enzyms CAPN6 und in mindestens einem weiteren Test die Inhibierung der Spaltung eines Substrats der Enzyme Calpain I und/oder II durch Testsubstanzen mißt und die Testsubstanzen auswählt, die das Enzym CAPN6 und mindestens ein weiteres der Calpaine hemmen.

Weiterhin ist Gegenstand der Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung von Calpaininhibitoren, dadurch gekennzeichnet, daß man die Inhibierung der Spaltung eines Substrates des Enzyms CAPN6 bzw. der Calpaine I und/oder II durch Testsubstanzen in zellulären Systemen bestimmt und solche Testsubstanzen auswählt, die die Zellmembran passieren und die intrazelluläre Aktivität des Enzyms CAPN6 und/oder der Calpaine I und/oder II hemmen, die das Enzym CAPN6 nicht hemmen, jedoch die Enzyme Calpain I und/oder II oder die das Enzym CAPN6 hemmen, nicht jedoch die Enzyme Calpain I und/oder II. Auch Substanzen, die eine Aktivität in vitro gegenüber den Calpainen zeigen, ohne daß ihre Zellgängigkeit getestet wurden, werden vorteilhafterweise ausgewählt. Zeigt sich in einem anschließenden Assay, das diese Substanzen nicht oder nur schlecht zellgängig sind, so kann durch Derivatisierung ihre Zellpermeabilität verbessert werden.

Humane μ - und m-Calpainproteinsequenzen wurden für eine Homologiesuche in der EST-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) unter Verwendung des BLAST Verfahrensprogramms verwendet. Es wurde eine Sequenz mit der Bezeichnung EST AA050030 gefunden, die eine für Calpaine typische Sequenz aufweist. Mit Hilfe dieser Sequenz ließ sich ein Klon aus der Maus darstellen, der für ein Gen codiert, dessen erfindungsgemäße Genprodukt als neues Calpain die Bezeichnung CAPN6 (= nCL-4) erhielt. Die Nucleinsäuresequenz des Klons nCL-4 ist Sequenz SEQ ID NO: 1 zu entnehmen. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Calpains CAPN6 ist der Sequenz SEQ ID NO: 2 zu entnehmen. Die unter Berücksichtigung eines vorhandenen Introns deduzierte Aminosäuresequenz weist eine typische Calpainsignatur auf, wobei eine Zuordnung zu den bekannten Calpain-Subfamilien μ Calpain, mCalpain, nCL-1 oder nCL-2 aufgrund der geringen Homologie nicht möglich ist. Es handelt sich bei dem Calpain CAPN6 um ein neues bisher unbekanntes Calpain. Die weiteren Untersuchungen mit dieser Sequenz aus Mäusen in der EST-Datenbank lieferte darüberhinaus noch 4 humane Teilsequenzen (AA169715, C17331, C16980 und T39424) mit einer Homology zur Maus CAPN6-Sequenz. Diese Teilsequenzen konnten zu einer fortlaufenden Sequenz,

die für ein 374 Aminosäuren langes Protein kodiert, zusammengesetzt werden. Dieser Sequenz fehlt sowohl das typische Startcodon für Methionin als auch das Stopcodon. Bei dieser Sequenz handelt es sich deshalb wohl nur um eine Teilsequenz des humanen Orthologue zur klonierten Maussequenz. Die Homologie beider Sequenzen über die 374 Aminosäuren liegt bei 94,9% (Fig. 1).

- 5 Die von der Gensequenz SEQ ID NO: 1 abgeleitete Proteinsequenz zeigt mit 30% Homologie die größte Homologie zum bekannten *Caenorhabditis elegans* Gen tra-3 über die gesamte Aminosäuresequenz. Die Homologie zu den anderen bekannten vertretbaren Calpainen liegt zwischen 20,9% (Ratten nCL-2) bis zu 25,4% (Maus mCalpain). In einem Sequenzvergleich nach Lipman-Pearson (Ktup1 2, Gap Penalty 4, Gap Length Pena:Lty 12) zwischen CAPN6 und humanen CAPN1 (= CAN1_HUMAN, Aoki et al., FEBS Lett. 205, 1986: 313-317), humanen CAPN2 (= CAN2_HUMAN, Aoki et al., Biochemistry 27, 1988: 8122-8128), Ratten-CAPN2 (= CAN2_RAT, Deluca et al., Biochim. Biophys. Acta 1216, 1993: 81-93), humanen CAPN3 (= CAN3_HUMAN, Richard et al., Cell 81, 27-40) Ratten-CAPN3 (= CAN3_RAT, Sorimachi et al., LT. Biol. Chem. 264, 1989: 20106-20111) und *Drosophila* Calpain (= DMCLPNGCM_1) über Teilsequenzen von 230-520 Aminosäuren wurden leicht größere Homologien von 32,8 bis 39,5% gefunden, die aber insgesamt geringer als die Homologien zu tra-3 liegen (Fig. 1, Alignment, Clustal method with PAM25 residue weight tabl.). Neben tra3 weist CAPN6 eine ausgeprägte Homologie zum kürzlich beschriebenen CAPN5-Calpain auf (44,2% Homologie Aktenzeichen P 19 718 248,8).

- 10 Sequenzvergleiche zwischen der Maus und humanen CAPN6-Sequenz in verschiedensten Datenbanken ergaben Homologien zu CalpA, Tra-3 und humanen Sequenzen mit den Bezeichnungen C16980, T39424, AA16971, R93331 und G17331 über deren Funktionen keine Angaben gemacht wurden. Die Sequenzvergleiche wurden mit der Genbank EST- und Datenbanken am National Center for Biotechnology Information (<http://Hwww.ncbi.nlm.nih.yor>) und der Wash-U-Datenbank durchgeführt (Homo sapiens). In den Datenbanken wurde außerdem eine Maus EST-Sequenz mit der Bezeichnung AA050030 und der Bezeichnung als Calpain gefunden. Weitere Angaben konnten den Datenbanken nicht entnommen werden. Die vollständigen Gensequenzen von AA16971T, R93331, C17331 und AA050030 sind unbekannt.

- 15 Beide Calpaine (CAPN5 und CAPN6) weisen gemeinsame Eigenschaften auf, die sie von den anderen Calpainen unterscheiden. CAPN5 und CAPN6 weisen im Vergleich zu den anderen Calpainen neben einer verkürzten Domäne I ein verändertes C--terminales Ende auf, das keine ausgeprägte Homologie zur Domäne IV der anderen Calpaine hat. Im Bereich der Domäne IV liegt die Konsensussequenz der Ca^{2+} -Bindungsstelle der Calpaine (sog. "EF-hand"). Diese Ca^{2+} -Bindungsstelle fehlt im Falle von CAPN5 und CAPN6, daß heißt möglicherweise wird kein Ca^{2+} an der Domäne IV gebunden und die Proteine werden auf anderem Wege aktiviert. Sie sind damit die einzigen Vertebraten-Calpaine, denen die Calmodulin ähnliche Domäne IV fehlt.

- 20 Die abgeleitete CAPN6-Aminosäuresequenz besitzt als weitere Besonderheit ein verändertes katalytisches Zentrum. Nur der Asn-Rest in Position 284 ist konserviert. Der Cysteinrest in Position 81 und der Histidinrest in Position 252 wurden jeweils gegen Lysin bzw. Tyrosin in der Maus CAPN6-Sequenz ausgetauscht. Darüberhinaus wurden weitere ausgetauschte Aminosäuren beim Vergleich der CAPN6 Sequenzen SEQ ID No. 1 und SEQ ID No. 3 mit dem humanen Calpain I (= CAPN1, Aoki et al., FEBS Lett. 205, 1986: 313-317) im Bereich des katalytischen Zentrums identifiziert. So sind die Aminosäuren Alanin und Threonin in den Positionen 122 und 125 des CAPN1 gegen Serin und Alanin in den Positionen 88 und 91 im CAPN6 verändert. Ebenfalls verändert sind die Aminosäuren Histidin, Alanin, Serin und Tryptophan in den Positionen 272, 273, 275 und 298 im CAPN1 zu Tyrosin, Threonin, Threonin und Leucin in den Positionen 252, 253, 255 und 286 im CAPN6. Die Zuordnung der Aminosäuren an den verschiedenen Positionen der Proteine CAPN1 und CAPN6 erfolgt durch Sequenzvergleich und Zuordnung der konservierten Regionen der Proteine zueinander, so daß eine maximale Übereinstimmung zwischen den Proteinen auf Aminosäureebene erfolgt. So können beispielsweise dieselben Sequenzen in unterschiedlichen Proteinen einer Proteinfamilie an sehr unterschiedlichen Stellen bzw. Position lokalisiert werden.

- 25 Die humane CAPN6-Sequenz weist zusätzlich zum Austausch des Cysteinrestes einen Austausch des Tyrosins in Position 254 gegen Histidin auf (Tabelle 1). Eine mögliche Erklärung könnte beispielsweise sein, daß CAPN6 eine gegenüber den anderen Calpainen geänderte Substratspezifität hat oder das aktive Zentrum nicht kritisch für die CAPN6-Funktion ist, das es ein Hemmstoff anderer Calpaine ist oder das CAPN6 ein Pseudogen ist. Diese letzte Möglichkeit scheint aufgrund der Vielzahl der konservierten Aminosäuren unwahrscheinlich zu sein. Wahrscheinlich kann der Cysteinrest in Position 89 in der Katalysereaktion die Funktion des fehlenden Cysteinrestes in Position 81 übernehmen. Selbst wenn CAPN6 keine Proteaseaktivität hätte, was sehr unwahrscheinlich ist, so könnte es an regulatorischen Prozessen beteiligt sein, möglicherweise in dem es mit anderen Calpainen um Bindungsplätze an Cofaktoren oder Substraten konkurriert.

55

60

65

Tabelle 1

CAPN6 genomische Sequenzen

Aminosäure Nr.	81*	89	254*	284*	286 ¹
Maus CAPN6 (129 ES Zellen DNA)	K	C	Y	N	L
Mensch CAPN6 (HeLa Zellen DNA)	K	C	H	N	L
andere Calpaine	C	S/C	Y	N	W

* Aminosäuren des aktiven Zentrums (Arthur et al., FEBS Lett. 368, 1995: 397 - 400)

¹ niedrige Aktivität ohne Leucin in m-Calpain (Arthur et al., FEBS Lett. 368, 1995: 397 - 400)

Tra-3 ist an der Geschlechtsbestimmung von *Caenorhabditis elegans* beteiligt. In einer Kaskade von mehreren Genen und deren Genprodukten entscheidet tra-3 mit darüber, ob sich *Caenorhabditis* Männchen oder Hermaphroditen entwickeln (Kuwabara P.E. et al., TIG, Vol. 8, No. 5, 1992: 164-168). Tra-3 scheint an der Spermatogenese beteiligt zu sein. Die Konservierung der Aminosäuren in den verschiedenen Domänen zwischen Maus CAPN6 und tra3 beträgt 39,2%; 42,0%; 30,9% und 22% jeweils für die Domänen I, II, III und T.

Ausgehend von aus (Ia) 17 Mausembryo mRNA abgeleiteten cDNA konnte mit Hilfe einer modifizierten RACE-Methode (= rapid amplification of cDNA ends) nach Frohman et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1988, 8998-9002) bzw. Edwards et al. (Nucl. Acids Res. 19, 1991, 5227-5232) unter Verwendung der oben genannten Primer (Ca16 und Ca19) sowie Sequenzen, die sich vom EST AA050030 ableiten, die Gesamtsequenz des Klones CAPN6 kloniert werden. Die SEQ ID No. 1 kodiert für ein Protein mit 641 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 74,6 kDa. Dem Startcodon Methionin ist eine typische Sequenz für den Translationsstart vorgelagert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung mehrerer cDNA-Klone mit der genannten Sequenz bestätigt.

Fig. 2 gibt die Homologien zwischen Maus CAPN5 (= nCL-3), human CAPN5 (= nCL-3), Maus CAPN6 (= nCL-4) und humanen CAPN6 (= nCL-4) wieder. Fig. 2 zeigt außerdem die Sequenzen von *Caenorhabditis* tra-3, humanen p94, Maus m-Calpain, humanen μ -Calpain und Ratten nCL-2. Aminosäuren, die zwischen den verschiedenen Calpainen und CAPN6 übereinstimmen sind durch dunkle Kästchen gekennzeichnet. Striche deuten Lücken an, die um eine maximale Übereinstimmung der Sequenzen zu erreichen, eingeführt wurden. Aus der humanen p94-Sequenz wurden zwei Sequenzen der Übersichtlichkeit wegen entfernt. Diese Bereiche wurden mit = gekennzeichnet. Die konservierten Aminosäuren des katalytischen Zentrums wurden mit Pfeilen markiert. Die CAL6 und CAL9 entsprechenden Aminosäure-Sequenzen wurden unterstrichen. Die Domänenbezeichnungen wurden über den relevanten Sequenzsegmenten angegeben.

Fig. 3 gibt den phylogenetischen Stammbaum der verschiedenen Calpaine wieder. Die phylogenetischen Analysen zur Aufstellung dieses Stammbaums wurden unter Verwendung der nächsten Nachbar-Methode (Saitou et al. Mol. Biol. Evol. 4, 1987, 406-425) unter Ausschluß der Lücken durchgeführt. Mit Hilfe dieser phylogenetischen Analysen konnten die Vertebraten-Calpaine in sechs verschiedene Gruppen aufgeteilt werden (Fig. 3, rechte Seite). Die Nicht-Vertebraten-Calpaine lassen sich der CAPN5 (= nCL-3-) und CAPN6 (= nCL-4-) Gruppe als nächste Nachbarn zuordnen und stehen in einer eigenen Gruppe. Die CAPN5 und CAPN6 Gene bilden damit je eine eigene Gruppe von Calpainen, die eine größere Ähnlichkeit zu Invertebraten Calpaine haben als zu Vertebraten Calpaine. Die Länge der horizontalen Linien ist proportional zur phylogenetischen Entfernung der verschiedenen Calpaine. Die Länge der vertikalen Linien ist ohne Bedeutung. Die für die Aufstellung des phylogenetischen Stammbaums verwendeten Sequenzen haben die folgenden SWISS-PROT- und EMBL-Nummern ("accession numbers"): Mensch m (P17655), μ (P07384), p94 (P20807); Ratten m (Q07009), nCL-2 (D14480), p94 (P16259); Maus p94 (X92523); Hühner m (D38026), μ (D38027), μ /m (P00789), p94 (D38028); Nematoden tra-3 (U12921); *Drosophila* Calp A (Q11002) und Dm (X78555), *Schistosoma* (P27730). Die humane nCL-2-Teilsequenz entspricht der Translation des EST-Klon AA026030 (Hellier et al., 1995, The Wasch U-Merck EST-Projekt).

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des EST-Klon AA026030 weist eine höhere als übliche Homologie nach dieser Analyse zur Ratten nCL-2-Sequenz auf. Da hier nur eine Teilsequenz für die Analyse verwendet wurde, hat der für nCL-2 erhaltene phylogenetische Stammbaum eine höhere Ungenauigkeit. Die Nematoden CPL1-Sequenz ist die korrigierte Version wie sie von Barnes und Hodjkin (EMBL, 1996, 15: 4477-4484) verwendet wurde.

Die ersten 7 Exons wurden, wie sie aus der EMBL-Datenbank (Accession No. L25598) zu entnehmen sind, verwendet, während die letzten 5 Exons durch Verbindung der Nucleotide 8028-8133, 8182-8239, 8729-8818, 8865-8983 und 9087 bis zum Ende erhalten wurde. Die abgeleitete N-terminale Sequenz ist aufgrund ihrer Länge und ihrer vielen Glycinreste für Calpaine ungewöhnlich.

Das erfindungsgemäße neue gewebspezifische Calpain CAPN6 wird nur im Gewebe aus der Plazenta exprimiert (Fig. 4). Die menschliche Plazenta ist ein rasch wachsendes und sich schnell ausdifferenzierendes Organ. Sie wird deshalb auch als "pre malignes Gewebe" bezeichnet, da sie ein hochinvasives Gewebe ähnlich dem von malignen Tumoren ist.

Proteasen spielen eine zentrale Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung von Zellen und damit auch in der Plazenta. Die Plazenta ist reich an Proteasen und Proteaseinhibitoren, die in einem ausgewogenen Gleichgewicht die Entwicklung der Plazenta ermöglichen. CAPN6 scheint hier eine wichtige Rolle als Protease zu spielen und/oder ist möglicherweise an der Regulation anderer Calpain-Cystein-Proteasen beteiligt.

Dort spielt es möglicherweise bei Krankheitsprozessen der Placenta wie der Gestose (= Präeklampsie) eine Rolle, die in 5 bis 7% aller Schwangerschaften auftritt. Präeklampsie (= schwangerschaftsinduzierter Bluthochdruck) ist eine der häufigsten schwangerschaftsbedingten Komplikationen, charakterisiert durch Hypertonie und Proteinurie, häufig kombiniert mit exzessiven Ödemen und unter Umständen mit Krampfanfällen. Präeklampsie während der Schwangerschaft ist eine wichtige Ursache für den Tod von Mutter und Kind, von Frühgeburten oder in leichteren Fällen von Unterernährung oder Wachstumsstörungen des Embryos. Es handelt sich um ein multifaktorielles Geschehen an dem beispielsweise genetische Faktoren (rezessive oder dominante Gene), die mütterliche Immuntoleranz, Vasodilator/Vasoconstriktorungleichgewichte und vermutlich auch CAPN6 beteiligt ist.

Frauen, die an Präeklampsie erkrankt sind, zeigen einen veränderten Vasopressinase- und Angiotensinasespiegel, der möglicherweise durch CAPN6 regulativ beeinflusst wird.

Eine weitere mögliche Funktion von CAPN6 könnte die Regulation des Abbaus von Somatostatin, Glucagon und Wachstumshormon in der Placenta sein und damit das Wachstum des Foetus beeinflussen. Auch der Abbau von mütterlichem Serumproteinen könnte durch CAPN6 beeinflusst werden, die ebenfalls das Wachstum des Foetus stimulieren.

Möglicherweise nimmt CAPN6 am komplexen Geschehen der Plazentaschleimhaut während der Embryogenese teil und steuert so die durch z. B. $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ induzierte Apoptose der Trophoblasten, in dem es andere Calpaine reguliert. CAPN6 scheint damit an der Embryonalentwicklung beteiligt zu sein.

Für die Identifizierung von selektiven Calpaininhibitoren sind möglichst spezifische Verfahren zur Identifizierung der Inhibitoren erforderlich. Wichtig dabei ist, daß die selektierten Inhibitoren nur das gewünschte oder die gewünschten Calpaine hemmen, nicht jedoch andere Cystein-Proteasen und damit in physiologische Prozesse eingreifen.

Die auf ihre inhibitorische Aktivität hin zu prüfenden Testsubstanzen können beispielsweise chemische Substanzen, mikrobielle oder pflanzliche Extrakte sein. Sie werden üblicherweise neben den Test auf ihre Inhibitoraktivität gegenüber CAPN6, Calpain I und/oder II auf ihre Aktivität gegenüber Cathepsin B oder andere Thiolproteasen getestet.

Idealerweise sollten gute Inhibitoren keine oder nur geringe Aktivität gegenüber Cathepsin B, L. Elastase, Papain, Chymotrypsin oder andere Cystein-Proteasen aufweisen, aber eine gute Aktivität gegenüber den Calpainen I und II aufweisen.

Durch das erfindungsgemäße neue gewebspezifische Calpain CAPN6 können mit den erfindungsgemäßen Verfahren Inhibitoren identifiziert werden, die zu ihrer inhibitorischen Wirkung zwischen den verschiedenen Calpainen Calpain I, II, nCL-1 nCL-2 und/oder nCL-4 diskriminieren können.

Die verschiedenen Inhibitortests wurden dabei wie folgt durchgeführt:

Cathepsin B-Test

Die Cathepsin B-Hemmung wurde analog einer Methode von S. Hasnain et al., LT. Biol. Chem. 1993, 268, 235–240 bestimmt.

Zu 88 μl Cathepsin B (Cathepsin B aus menschlicher Leber von der Firma Calbiochem, verdünnt auf 5 Units in 500 μM Puffer) werden 2 μl einer Inhibitorlösung, hergestellt aus der zu testenden chemischen Substanz, einem mikrobiellen oder pflanzlichen Extrakt und DMSO (Endkonzentration: 100 μM bis 0,01 μM) zugegeben. Dieser Ansatz wird für 60 Minuten bei Raumtemperatur (= 25°C) vorinkubiert und anschließend die Reaktion durch Zugabe von 10 μl 10 mM Z-Arg-Arg-pNA (in Puffer mit 10% DMSO) gestartet. Die Reaktion wird 30 Minuten bei 405 nm im Mikrotiterplattenreader verfolgt. Aus den maximalen Steigungen werden anschließend die IC_{50} 's bestimmt.

Calpain I und II-Test

Die Aktivität der Calpaininhibitoren wurde in einem colorimetrischen Test mit Casein nach Hammarsten (Merck, Darmstadt) als Substrat untersucht. Der Test wurde in Mikrotiterplatten, entsprechend der Veröffentlichung von Buroker-Kilgore und Wang in Anal. Biochem. 208, 1993, 387–392, durchgeführt. Als Enzyme wurde Calpain I (0,04 U/Test) aus Erythrozyten und Calpain II (0,2 U/Test) aus Nieren, beide vom Schwein, der Firma Calbiochem, benutzt. Die zu testenden Substanzen wurden mit dem Enzym für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wobei eine Konzentration von 1% des Lösungsmittels DMSO nicht überschritten wurde. Nach Zugabe des Bio-Rad Farbreagens erfolgte die Messung der optischen Dichte bei 595 nm in dem Easy Reader EAR 400 der Firma SLT. Die 50%ige Aktivität des Enzyms ergibt sich aus den optischen Dichten, die bei der maximalen Aktivität des Enzyms ohne Inhibitoren und der Aktivität des Enzyms ohne Zugabe von Kalzium bestimmt wurden.

Die Aktivität von Calpaininhibitoren kann ferner mit dem Substrat Suc-Leu-Tyr-AMC bestimmt werden. Diese fluorimetrische Methode ist bei Zhaozhao Li et al., LT. Med. Chem. 1993, 36, 3472–3480 beschrieben.

Da Calpaine intrazelluläre Cysteinproteasen sind, müssen Calpaininhibitoren die Zellmembran passieren, um den Abbau von intrazellulären Proteinen durch Calpain zu verhindern. Einige bekannte Calpaininhibitoren, wie zum Beispiel E 64 und Leupeptin, überwinden die Zellmembranen nur schlecht und zeigen dementsprechend, obwohl sie gute Calpaininhibitoren darstellen nur schlechte Wirkung an Zellen. Es ist deshalb vorteilhaft einen zusätzlichen Test für die Membrangängigkeit von potentiellen Calpaininhibitoren wie den humanen Plättchentest durchzuführen.

Plättchen-Test zur Bestimmung der zellulären Aktivität von Calpaininhibitoren

Der Calpain vermittelte Abbau von Proteinen in Plättchen wurde, wie von Zhaozhao Li et al., LT. Med. Chem., 36, 1993, 3472–3480 beschrieben, durchgeführt. Humane Plättchen wurden aus frischem Natrium-Citrat-Blut von Spendern isoliert und in Puffer (5 mM Hepes, 140 mM NaCl und 1 mg/ml BSA, pH 7,3) auf 10^7 Zellen/ml eingestellt.

Plättchen (0,1 ml) werden für 5 Minuten in 1 μl an verschiedenen Konzentrationen an potentiellen Inhibitoren (gelöst in DMSO) vorinkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von Kalziumionophor A 23187 (1 μM im Test) und Kalzium (5 mM im Test) und eine weitere Inkubation von 5 Minuten bei 37°C. Nach einem Zentrifugationsschritt wurden die Plättchen in

SDS-Page Probenpuffer aufgenommen, 5 Minuten bei 95°C gekocht und die Proteine in einem 8%igen Gel aufgetrennt. Der Abbau der beiden Proteine Actin bindendes Protein (= ABP) und Tal in wurde durch quantitative Densitometrie verfolgt. Nach der Zugabe von Kalzium und Ionophor verschwanden diese Proteine und es entstanden neue Banden von kleiner 200 Kd Molekulargewicht. Daraus wird die halb maximale Enzymaktivität mit oder als Kontrolle ohne Inhibitor bestimmt.

Ebenfalls geeignet für die Testung der Membrangängigkeit sind Gewebsteile wie Gehirnschnitte oder Zellkulturen.

Test auf Hemmung gegenüber CAPN6 wird in Zellen durchgeführt, die dieses Protein exprimieren und sich dieses mit einem spezifischen Antikörper nachweisen läßt. Werden Zellen mit z. B. Kalzium und dem entsprechenden Ionophor stimuliert, führt dies zu einer Aktivierung von CAPN6. Takaomi Saido beschrieb 1992 im LT. Biochem. Vol. 11, 81–86 die autolytische Transition von μ -Calpain nach Aktivierung und der Nachweis mit Antikörpern. Entsprechende Antikörper werden für den Nachweis von CAPN6 erzeugt. Calpain-Inhibitoren verhindern die autolytische Transition und eine entsprechende Quantifizierung ist mit Antikörpern möglich.

Neben den beschriebenen in vitro Tests so wie dem zellulären Plättchentest eignen sich alle weiteren dem Fachmann bekannten Calpaintests wie der Test auf Hemmung des Glutamat induzierten Zelltods an corticalen Neuronen (Maulucci-Gedde M.A. et al., LT. Neurosci. 7, 1987: 357–368), der Kalzium-vermittelte Zelltod in NT2-Zellen (Squier M.K.T. et al., LT. Cell. Physiol., 159, 1994: 229–237, Patel T. et al., FASEB Journal 590, 1996: 587–597) oder die Analyse in Gewebeproben nach Abbauprodukten von Proteinen wie Spectrin, MAP2 oder Tau (Ami Arai et al., Brain Research, 1991, 555, 276–280, James Brorson et al., Stroke, 1995, 26, 1259–1267).

Für die in vitro-Tests von CAPN6 wird das Calpain CAPN6 oder seine tierischen oder sein humanes Homologes aus Geweben oder Zellen in denen das Enzym üblicherweise oder artifiziell (z. B. durch rekombinante Expression) exprimiert wird wie vorteilhafterweise das Placenta oder aus Zellen oder Mikroorganismen, die mindestens eine Genkopie und/oder einen Vektor mit mindestens einer Genkopie des CAPN6-Gens, seiner allelischen Varianten oder Analoge enthalten, aufgereinigt und als Rohextrakt oder als reines Enzym verwendet.

Für die erfindungsgemäßen Verfahren werden die verschiedenen Calpaininhibitortests vorteilhafterweise in Kombination mit dem Test auf Hemmung der CAPN6-Enzymaktivität durch potentielle Inhibitoren durchgeführt. Dabei werden Inhibitoren so ausgewählt, daß sie entweder nur das Enzym CAPN6 hemmen und nicht die anderen Calpaine oder umgedreht nur die anderen Calpaine und nicht das Enzym CAPN6 oder das Enzym CAPN6 und mindestens ein weiteres Calpain. Inhibitoren gegen CAPN6 können vorteilhafterweise im Falle von Gestose verwendet werden.

Die verschiedenen Inhibitortests werden dabei so ausgeführt, daß neben dem Test auf die inhibierende Wirkung der Testsubstanz gegenüber CAPN6, Calpain I und/oder II als Kontrolle die Tests ohne die Testsubstanz durchgeführt wird. Durch diese Testanordnung lassen sich einfach die inhibitorischen Wirkungen der Testsubstanzen erkennen.

Ein weiteres erfindungsgemäßes Verfahren verwendet CAPN6 oder dessen allelische Varianten, Analoge oder synthetischen Derivate vorteilhafterweise zum Schutz vor der enzymatischen Wirkung anderer Calpaine.

Ein weiteres erfindungsgemäßes Verfahren verwendet das Enzym CAPN6 zum Screening nach neuen Calpaininhibitoren, wobei diese Inhibitoren vorteilhafterweise generell alle Calpaine oder einzelne Calpaine wie Calpain I, II, nCL-1, nCL-2 oder CAPN6 hemmen können. Die verschiedenen Testsubstanzen können dabei einzeln oder parallel in Testsystemen getestet werden. Vorteilhafterweise werden die Testsubstanzen in parallelen, automatisierten Testsystemen auf ihre inhibitorische Wirkung hin gescreent.

Für die Inhibitortests sind generell alle Substanzen geeignet. So stammen die Substanzen beispielsweise aus der klassischen chemischen Synthese, aus der Kombinatorik, aus mikrobiellen, tierischen oder pflanzlichen Extrakten. Unter mikrobiellen Extrakten sind beispielsweise Fermentationsbrühen, Zellaufschlüsse von Mikroorganismen oder Substanzen nach Biotransformation zu verstehen. Auch Zellfraktionen sind für die Tests geeignet.

Für die Klonierung des CAPN6-Gens oder seiner tierischen Homologen oder seines humanen Homologen, seiner allelischen Varianten oder Analogen eignen sich alle prokaryontischen oder eukaryontischen Expressionssysteme, die zur Isolierung eines enzymatisch aktiven Genprodukts geeignet sind. Bevorzugt werden Expressionssysteme, die eine Expression der CAPN6-Gensequenzen in bakteriellen, pilzlichen oder tierischen Zellen ganz besonders bevorzugt in Insektenzellen ermöglicht. Unter enzymatisch aktivem Genprodukt sind CAPN6-Proteine zu verstehen, die direkt nach Isolierung aus dem Expressionsorganismus wie beispielsweise aus einer prokaryotischen oder eukaryotischen Zelle oder nach Renaturierung ein aktives Protein ergeben, das in der Lage ist mindestens ein bekanntes Calpainsubstrat wie die oben genannten oder über Autokatalyse sich selbst zu spalten.

Für die Bestimmung der enzymatischen Aktivität sind alle dem Fachmann bekannten Calpaintests wie in vitro-Tests wie die oben beschriebenen Tests für Calpain I und II oder zelluläre Tests wie der Plättchentest geeignet. Dabei können als Detektionsmöglichkeit Tests verwendet werden, die auf Basis eines colorimetrischen Assays (Buroker-Kilgore M. et al., Anal. Biochem. 208, 1993: 387–392) oder auf Basis eines Fluoreszenz-Assays beruhen.

Außerdem sind auch alle Teilsequenzen, die das katalytische Zentrum des CAPN6 Gens und/oder weitere Sequenzen des CAPN6 Gens und/oder andere Calpaingensequenzen und/oder andere Sequenzen enthalten und enzymatische Aktivität zeigen, unter enzymatisch aktivem Genprodukt von CAPN6 zu verstehen.

Unter Wirtsorganismen sind alle prokaryotischen oder eukaryontischen Organismen, die als Wirtsorganismen geeignet sind, sind beispielsweise Bakterien wie *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces lividans*, *Streptococcus carnosus*, Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, Pilze wie *Aspergillus niger*, Insektenzellen wie *Spodoptera frugiperda*, *Trichoplusia*-Zellen oder alle anderen Insektenzellen, die für eine virale Expression geeignet sind, oder tierische Zellen wie CV1, COS, C127, 3T3 oder CHO oder humane Zellen zu verstehen.

Unter Expressionssysteme sind die Kombination aus den oben beispielhaft genannten Expressionsorganismen und den zu den Organismen passenden Vektoren wie Plasmide, Viren oder Phagen wie das T7 RNA Polymerase/Promoter System oder Vektoren mit regulatorischen Sequenzen für den Phagen λ zu verstehen.

Bevorzugt sind unter dem Begriff Expressionssysteme die Kombination aus *Escherichia coli* und seinen Plasmiden und Phagen oder das Baculovirus-System und die entsprechenden Insektenzellen wie *Spodoptera frugiperda* zu verstehen.

Für die vorteilhafte erfindungsgemäße Expression des CAPN6-Gens sind außerdem weitere 3' und/oder 5' Terminale regulatorische Sequenzen geeignet.

Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression des CAPN6 Gens ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, daß das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder daß es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die CAPN6 Genexpression positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

Unter "Enhancer" sind beispielsweise DNA-Sequenzen zu verstehen, die über eine verbesserte Wechselwirkung zwischen RNA-Polymerase und DNA eine erhöhte CAPN6-Genexpression bewirken.

Dem CAPN6-Gen mit oder ohne vorgeschaltetem Promotor bzw. mit oder ohne Regulatorgen können ein oder mehrere DNA-Sequenzen vor- und/oder nachgeschaltet sein, so daß das Gen in einer Genstruktur enthalten ist.

Die Genexpression des CAPN6-Gens läßt sich darüber hinaus auch durch Erhöhen der CAPN6-Genkopienzahl erhöhen. Zur Erhöhung der Genkopienzahl wird das CAPN6-Gen beispielsweise in einem CHO-Expressionsvektor amplifiziert. Als Vektoren eignen sich auch 5 Vektoren der pED-Reihe – dicistronische Vektoren –, die auch das amplifizierbare Markergen Dihydrofolat Reduktase enthalten. Details können den Current Protocols in Molecular Biology Vol 2, 1994 entnommen werden.

Eine Steigerung der CAPN6-Enzymaktivität läßt sich zum Beispiel gegenüber dem Ausgangsenzym durch Veränderung des CAPN6-Gens oder seiner tierischen Homologen durch klassische Mutagenese wie UV-Bestrahlung oder Behandlung mit chemischen Mutagenen und/oder durch gezielte Mutagenese wie site directed mutagenesis, Deletion(en), Insertion(en) und/oder Substitution(en) erzielen. Eine Erhöhung der Enzymaktivität kann beispielsweise erreicht werden, indem das katalytische Zentrum so verändert wird, daß das zu spaltende Substrat rascher umgesetzt wird. Auch kann eine erhöhte Enzymaktivität neben der beschriebenen Genamplifikation durch Ausschaltung von Faktoren, die die Enzymsynthese reprimieren und/oder durch Synthese aktiver statt inaktiver CAPN6-Proteine erreicht werden. Auf diesem Weg können erhöhte Enzymmengen für die in vitro-Tests zur Verfügung gestellt werden.

CAPN6 oder seine tierischen Homologen oder sein humanes Homolog lassen sich vorteilhafterweise ausgehend von genomischer DNA oder cDNA unter Verwendung beispielsweise der PCR-Technik (siehe Molekular Cloning, Sambrook, Fritsch and Maniatis, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Second Edition 1989, Kapitel 14, 1–35, ISBN 0-87969-309-6 und Saiki et al., Science, 1988, Vol. 239, 487ff) klonieren, bevorzugt läßt sich CAPN6 unter Verwendung von genomischer DNA und besonders bevorzugt unter Verwendung von genomischer DNA aus Mauszellen oder humanen Zellen klonieren.

Als Wirtsorganismus für die Klonierung eignen sich beispielsweise alle Escherichia coli-Stämme, bevorzugt der Escherichia coli Stamm DH10B. Als Vektoren für die Klonierung sind alle Vektoren geeignet, die für die Expression in Escherichia coli geeignet sind (siehe Molekular Cloning, Sambrook, Fritsch and Maniatis, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Second Edition 1989, ISBN 0-87969-309-6). Besonders geeignet sind beispielsweise Vektoren, die sich von pBR oder pUC ableiten oder shuttle-Vektoren, ganz besonders geeignet ist pBluescript.

Nach Isolierung und Sequenzierung sind CAPN6-Gene mit Nukleotidsequenzen erhältlich, die für die in SEQ ID NO: 2 angegebene Aminosäuresequenz oder deren Allelvarianten kodieren. Unter Allelvarianten sind CAPN6-Varianten zu verstehen, die 60 bis 100 % Homologie auf Aminosäureebene, bevorzugt 70 bis 100%, ganz besonders bevorzugt 80 bis 100% aufweisen. Allelvarianten umfassen insbesondere funktionelle Varianten, die durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus der in SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 dargestellten Sequenz erhältlich sind, wobei die CAPN6-Aktivität aber erhalten bleibt und die Sequenzen (a) Leu-Gly-Asn-Lys-Ala, (b) Ala-X-Ser-Cys-Leu-Ala, (c) Gly-Tyr-Thr-(His oder Tyr)-Thr-X-Thr und (d) Arg-X-Arg-Asn-Pro-Leu-Gly wie auch in den CAPN6-Genen, Analogen oder Derivaten vorhanden sind.

Unter Analoge von CAPN6 sind beispielsweise seine tierischen Homologen, verkürzte Sequenzen, Einzelstrang-DNA oder RNA der codierenden und nichtcodierenden DNA-Sequenz besonders antisense RNA zu verstehen.

Derivate von CAPN6 sind beispielsweise solche Derivate, die enzymatisch nicht oder nur schwer spaltbar sind wie die Nucleinsäurephosphonate oder -phosphothioate, bei denen die Phosphatgruppe der Nucleinsäuren gegen eine Phosphonat- bzw. Thioatgruppe ersetzt wurde.

Auch der Promotor, der der angegebenen Nukleotidsequenz vorgeschaltet ist, kann durch ein oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) verändert sein, ohne daß aber die Funktionalität bzw. Wirksamkeit des Promotors beeinträchtigt ist. Des weiteren kann der Promotor auch durch Veränderung seiner Sequenz in seiner Wirksamkeit erhöht oder komplett durch wirksamere Promotoren auch artfremder Organismen oder synthetischen Ursprungs ausgetauscht werden.

Die nach den erfindungsgemäßen Verfahren identifizierten Calpaininhibitoren eignen sich zur Herstellung von Medikamenten zur Behandlung von Krankheiten bei Calpainfehlfunktionen beispielsweise bei Krankheiten ausgewählt aus der Gruppe der kardiovaskulären, immunologischen, entzündlichen, allergischen, neurologischen, neurodegenerativen, oder onkologischen Erkrankungen wie beispielsweise Restenose, Arthritis, Ischämien des Herzen, der Niere oder des Zentralnervensystems (z. B. Hirnschlag), Entzündungen, Muskeldystrophien, Katarakten der Augen (Grauer Star), Verletzungen des Zentralnervensystems (z. B. Trauma), Alzheimer Krankheit, HIV-induzierte Neuropathy, Parkinsonsche- und Huntingtonsche Krankheit bevorzugt zur Herstellung von Medikamenten zur Behandlung von Krankheiten der Plazenta wie z. B. Gestose oder der Embryogenese.

Die erfindungsgemäßen CAPN6-Gensequenzen eignen sich vorteilhafterweise auch zur Diagnose von Krankheiten oder zur Gentherapie.

Beispiele

Beispiel 1

Klonierung des CAPN6-Gens

5

Die Maus CAPN6 Sequenz (EMBL accession number Y12583) wurde mit der RACE Methode unter Verwendung von Tag 17 Mäuseembryonen und Primersequenzen, die von der Sequenz LAST AA050030 abgeleitet wurden, kloniert. Ein Plasmidklon, der die entsprechenden EST-Sequenzen enthielt wurde vom I.M.A.G.E consortium (Research Genetics Inc.) erhalten. Das humane CAPN6-Homologe wurde über eine Homologierecherche in der EST-Datenbank unter Verwendung der Mausproteinsequenz und des tblastn-Algorithmus erhalten. Die gefundenen Teilsequenzen konnten zu einer unvollständigen Sequenz des humanen CAPN6 mit einer Länge von 1083 Nukleotiden zusammengefügt werden (SEQ ID NO: 3).

10

Beispiel 2

15

Expression des CAPN6-Gens in verschiedenen Geweben

Die Expression des CAPN6-Gens in den verschiedenen Geweben wurden mit Hilfe eines 32 P-markierten humane cDNA-Fragments mit einem humanen RNA Master Blot der Firma Clontech, welcher RNA 50 verschiedener Gewebe enthält, ermittelt. Die Hybridisierung und die hochstringenten Waschbedingungen wurden entsprechend den Vorschriften des Herstellers durchgeführt. Als CAPN6 cDNA-Fragment wurde eine 2,2 kb EcoRI/XhoI-Fragment, das das EST AA050030 beinhaltet für die Expressionsexperimente verwendet. CAPN6 wurde nur in Gewebe aus der Placenta exprimiert (siehe Fig. 4). Als Kontrolle wurde der Blot mit einer humanen Ubiquitin DNA Probe um die RNA Beladung zu ermitteln.

20

25

3. Beispiel

Lokalisierung des CAPN6 Gens auf dem Chromosom

30

Die Lokalisierung des Gens im Mensch erfolgte mit Hilfe des NIGMS Mensch/Nager somatischen Zellhybrid "mapping panel" (Coriell Cell Repositories). Als Primer-Sequenzen für die PCR-Reaktion wurden folgende Primer verwendet: 5'-gttgaaactgattgggtctg-3' und 5'-ctgtcttcccaaggggtctc-3'. Die PCR-Amplifikation wurde mit einer "Annealing"-Temperatur von 58°C durchgeführt und führte zu einem 200 bp Fragment. Die Ergebnisse wurden auf Übereinstimmung zwischen der Anwesenheit von menschlichen Chromosomen und dem PCR-Produkt untersucht. Die genaue Lokalisierung des Gens im menschlichen Chromosom erfolgte mit Hilfe des "Stanford G3 RH Panel" (Research Genetics) und Übermittlung der PCR-Ergebnisse an den Lokalisierungsservice des Stanford Human Genome Center (<http://www.shgc.stanford.edu>). Das Mensch CAPN6-Gen wurde auf dem X-Chromosom gekoppelt mit dem Marker DXS7356 gefunden.

35

40

4. Beispiel

Cathepsin B-Test

Die Cathepsin B-Hemmung wurde analog einer Methode von S. Hasnain et al., LT. Biol. Chem. 1993, 268, 235-40 bestimmt.

45

Zu 88 µL Cathepsin B (Cathepsin B aus menschlicher Leber (Calbiochem), verdünnt auf 5 Units in 500 µM Puffer) werden 2 µL einer Inhibitor-Lösung, hergestellt aus Inhibitor und DMSO (Endkonzentrationen: 100 µM bis 0,01 µM). Dieser Ansatz wird für 60 Minuten bei Raumtemperatur (25°C) vorinkubiert und anschließend die Reaktion durch Zugabe von 10 µL 10 mM Z-Arg-Arg-pNA (in Puffer mit 10% DMSO) gestartet. Die Reaktion wird 30 Minuten bei 405 nM im Mikrotiterplattenreader verfolgt. Aus den maximalen Steigungen werden anschließend die IC₅₀ bestimmt.

50

5. Beispiel

Calpain-Test

55

Die Aktivität der Calpain Inhibitoren wurde in einem colorimetrischen Test mit Casein nach Hammarsten (Merck, Darmstadt) als Substrat untersucht. Der Test wurde in der Mikrotiterplatte, entsprechend der Veröffentlichung von Buroker-Kilgore und Wang in Anal. Biochemistry 208, 387-392 (1993), durchgeführt. Als Enzym wurde CAPN6, welches in einem der oben beschriebenen Systemen exprimiert und anschließend gereinigt wurde, verwendet. Die Substanzen wurden mit dem Enzym für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wobei eine Konzentration von 1% des Lösungsmittels DMSO nicht überschritten wurde. Nach Zugabe des Bio-Rad Farbreagenz erfolgte die Messung der optischen Dichte bei 595 nm in dem Easy Reader EAR 400 der Firma SLT. Die 50%ige Aktivität des Enzyms ergibt sich aus den optischen Dichten, die bei der maximalen Aktivität des Enzyms ohne Inhibitoren und der Aktivität des Enzyms ohne Zugabe von Kalzium bestimmt wurden.

60

65

Plättchen-Test zur Bestimmung der zellulären Aktivität von Calpain-Inhibitoren

- 5 Der Calpain-vermittelte Abbau von Proteinen in Plättchen wurde, wie von ZhaozhaoLi et al., LT. Med. Chem. 1993, 36, 3472–3480 beschrieben, durchgeführt. Humane Plättchen wurden aus frischem Natrium-Citrat-Blut von Spendern isoliert und in Puffer (5 mM Hepes, 140 mM NaCl und 1 mg/ml BSA, pH 7,3) auf 10^7 Zellen/ml eingestellt. Plättchen (0,1 ml) werden für 5 Minuten mit 1 μ l an verschiedenen Konzentrationen an Inhibitoren (gelöst in DMSO) vorinkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von Kalziumionophor A 23187 (1 μ M im Test) und Kalzium (5 mM im Test) und eine weitere Inkubation von 5 Minuten bei 37°C. Nach einem Zentrifugationsschritt wurden die Plättchen in SDS-Page Probenpuffer aufgenommen, 5 Minuten bei 95°C gekocht und die Proteine in einem 8% igen Gel aufgetrennt. Der Abbau der beiden Proteine Actin bindendes Protein (ABP) und Tal in wurde durch quantitative Densitometrie verfolgt, da nach der Zugabe von Kalzium und Ionophor diese Proteine verschwanden und eine neue Bande im Bereich von 200 Kd Molekulargewicht entstand. Daraus wird die halb maximale Enzymaktivität bestimmt.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

(1) ALGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: BASF Aktiengesellschaft
- (B) STRASSE: Carl Bosch Strasse
- (C) ORT: Ludwigshafen
- (D) BUNDESLAND: Rheinland-Pfalz
- (E) LAND: Germany
- (F) POSTLEITZAHL: D-67056

(ii) ANMELDETITEL: Neue gewebsspezifische Calpaine, ihre
Herstellung und Verwendung

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 4

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 2069 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Mus musculus

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON: CAPN6

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
- (B) LAGE: 1..129

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 130..2055

DE 197 37 105 A 1

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR

(B) LAGE: 2056..2069

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

5	GGGGTTACCT GGCTAAGAGC AGCAGCAGCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGT AGCAGCAGCA	60
10	GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGCAGCAGCA GCAGGGTTCC TGAGCTAACT CAGACCTAGT	120
15	TTGATAGCA ATG GGT CCT CCT CTG AAG CTC TTC AAA AAC CAG AAG TAC	168
	Met Gly Pro Pro Leu Lys Leu Phe Lys Asn Gln Lys Tyr	
	1 5 10	
20	CAA GAA CTG AAG CAG GAG TGC ATG AAG GAT GGC CGC CTT TTC TGT GAC	216
	Gln Glu Leu Lys Gln Glu Cys Met Lys Asp Gly Arg Leu Phe Cys Asp	
	15 20 25	
25	CCA ACC TTC CTA CCG GAG AAT GAT TCT CTG TTT TTC AAC CGG CTG CTT	264
	Pro Thr Phe Leu Pro Glu Asn Asp Ser Leu Phe Phe Asn Arg Leu Leu	
	30 35 40 45	
30	CCT GGG AAG GTG GTG TGG AAG CGT CCA CAG GAC ATT TCT GAT GAC CCC	312
	Pro Gly Lys Val Val Trp Lys Arg Pro Gln Asp Ile Ser Asp Asp Pro	
	50 55 60	
35	CAC CTG ATT GTG GGC AAC ATC AGC AAC CAC CAG CTG ATC CAG GGC AGA	360
	His Leu Ile Val Gly Asn Ile Ser Asn His Gln Leu Ile Gln Gly Arg	
	65 70 75	
40	TTG GGG AAC AAG GCA ATG ATC TCT GCA TTT TCC TGT TTG GCT GTT CAG	408
	Leu Gly Asn Lys Ala Met Ile Ser Ala Phe Ser Cys Leu Ala Val Gln	
	80 85 90	
45	GAG TCA CAC TGG ACA AAG GCA ATT CCC AAC CAC AAG GAT CAG GAA TGG	456
	Glu Ser His Trp Thr Lys Ala Ile Pro Asn His Lys Asp Gln Glu Trp	
	95 100 105	
50	GAT CCT CGA AAG CCA GAG AAA TAC GCT GGA ATC TTT CAC TTC CGC TTC	504
	Asp Pro Arg Lys Pro Glu Lys Tyr Ala Gly Ile Phe His Phe Arg Phe	
	110 115 120 125	
55	TGG CAT TTT GGA GAA TGG ACC GAG GTG GTG ATT GAT GAC TTG CTT CCC	552
	Trp His Phe Gly Glu Trp Thr Glu Val Val Ile Asp Asp Leu Leu Pro	
	130 135 140	
60	ACC ATC AAC GGA GAT CTG GTC TTC TCA TTC TCC ACC TCC ATG AAT GAG	600
	Thr Ile Asn Gly Asp Leu Val Phe Ser Phe Ser Thr Ser Met Asn Glu	
	145 150 155	
65	TTT TGG AAT GCT CTA CTG GAA AAA GCG TAT GCA AAG CTG CTG GGC TGT	648
	Phe Trp Asn Ala Leu Leu Glu Lys Ala Tyr Ala Lys Leu Leu Gly Cys	
	160 165 170	

DE 197 37 105 A 1

TAT GAG GCT TTG GAT GGT CTG ACC ATC ACT GAT ATC ATC ATG GAC TTC Tyr Glu Ala Leu Asp Gly Leu Thr Ile Thr Asp Ile Ile Met Asp Phe 175 180 185	696	
ACT GGC ACA CTG GCT GAA ATC ATT GAC ATG CAG AAA GGA CGA TAC ACT Thr Gly Thr Leu Ala Glu Ile Ile Asp Met Gln Lys Gly Arg Tyr Thr 190 195 200 205	744	5
GAT CTT GTT GAG GAG AAG TAC AAG CTG TTT GGA GAA CTG TAC AAA ACG Asp Leu Val Glu Glu Lys Tyr Lys Leu Phe Gly Glu Leu Tyr Lys Thr 210 215 220	792	10
TTC ACC AAA GGA GGT CTA ATT TGC TGC TCC ATT GAG TCT CCC AGC CAG Phe Thr Lys Gly Gly Leu Ile Cys Cys Ser Ile Glu Ser Pro Ser Gln 225 230 235	840	15
GAG GAA CAA GAA GTT GAA ACA GAC TGG GGA CTA CTG AAG GGT TAT ACC Glu Glu Gln Glu Val Glu Thr Asp Trp Gly Leu Leu Lys Gly Tyr Thr 240 245 250	888	20
TAC ACC ATG ACT GAT ATT CGC AAG CTC CGT CTC GGA GAA AGA CTT GTG Tyr Thr Met Thr Asp Ile Arg Lys Leu Arg Leu Gly Glu Arg Leu Val 255 260 265	936	25
GAA GTC TTC AGT ACT GAG AAG CTG TAT ATG GTT CGC CTA AGG AAC CCA Glu Val Phe Ser Thr Glu Lys Leu Tyr Met Val Arg Leu Arg Asn Pro 270 275 280 285	984	30
TTG GGA AGA CAG GAA TGG AGT GGC CCC TGG AGT GAA ATT TCA GAG GAG Leu Gly Arg Gln Glu Trp Ser Gly Pro Trp Ser Glu Ile Ser Glu Glu 290 295 300	1032	35
TGG CAG CAA CTG ACT GTA ACA GAT CGC AAG AAC CTA GGA CTT GTT ATG Trp Gln Gln Leu Thr Val Thr Asp Arg Lys Asn Leu Gly Leu Val Met 305 310 315	1080	40
TCT GAT GAT GGA GAA TTT TGG ATG AGT CTG GAA GAT TTT TGC CAC AAC Ser Asp Asp Gly Glu Phe Trp Met Ser Leu Glu Asp Phe Cys His Asn 320 325 330	1128	45
TTT CAC AAA CTG AAT GTC TGC CGC AAT GTG AAT AAT CCT GTT TTT GGC Phe His Lys Leu Asn Val Cys Arg Asn Val Asn Asn Pro Val Phe Gly 335 340 345	1176	50
CGC AAG GAG CTG GAA TCA GTG GTG GGA TGT TGG ACT GTG GAT GAT GAC Arg Lys Glu Leu Glu Ser Val Val Gly Cys Trp Thr Val Asp Asp Asp 350 355 360 365	1224	55
CCT CTG ATG AAC CGA TCA GGA GGT TGC TAT AAC AAC CGT GAT ACC TTC Pro Leu Met Asn Arg Ser Gly Gly Cys Tyr Asn Asn Arg Asp Thr Phe 370 375 380	1272	60

65

DE 197 37 105 A 1

5	TTG CAG AAT CCT CAG TAC ATT TTC ACT GTG CCC GAG GAT GGC CAT AAA Leu Gln Asn Pro Gln Tyr Ile Phe Thr Val Pro Glu Asp Gly His Lys	1320
	385 390 395	
10	GTC ATC ATG TCA CTG CAA CAG AAG GAC CTA CGC ACT TAC CGC CGA ATG Val Ile Met Ser Leu Gln Gln Lys Asp Leu Arg Thr Tyr Arg Arg Met	1368
	400 405 410	
15	GGA AGA CCT GAT AAT TAC ATC ATT GGT TTT GAG CTC TTC AAG GTG GAG Gly Arg Pro Asp Asn Tyr Ile Ile Gly Phe Glu Leu Phe Lys Val Glu	1416
	415 420 425	
20	ATG AAC CGA AGG TTC CGT CTT CAC CAT CTG TAT ATT CAG GAG CGT GCT Met Asn Arg Arg Phe Arg Leu His His Leu Tyr Ile Gln Glu Arg Ala	1464
	430 435 440 445	
25	GGG ACT TCC ACT TAT ATC GAC ACC CGT ACT GTG TTT CTG AGC AAG TAT Gly Thr Ser Thr Tyr Ile Asp Thr Arg Thr Val Phe Leu Ser Lys Tyr	1512
	450 455 460	
30	CTG AAG AAG GGC AGC TAC GTG CTT GTT CCA ACC ATG TTC CAA CAT GGC Leu Lys Lys Gly Ser Tyr Val Leu Val Pro Thr Met Phe Gln His Gly	1560
	465 470 475	
35	CGT ACC AGT GAA TTT CTG CTG AGG ATC TTC TCT GAA GTG CCC GTC CAG Arg Thr Ser Glu Phe Leu Leu Arg Ile Phe Ser Glu Val Pro Val Gln	1608
	480 485 490	
40	CTC AGG GAA CTG ACC TTG GAC ATG CCC AAG ATG TCT TGC TGG AAC CTG Leu Arg Glu Leu Thr Leu Asp Met Pro Lys Met Ser Cys Trp Asn Leu	1656
	495 500 505	
45	GCA CGT GGC TAC CCA AAG GTG GTT ACC CAG ATC ACT GTC CAC AGT GCT Ala Arg Gly Tyr Pro Lys Val Val Thr Gln Ile Thr Val His Ser Ala	1704
	510 515 520 525	
50	GAG GGC CTG GAG AAG AAG TAT GCC AAT GAA ACT GTC AAT CCA TAT CTG Glu Gly Leu Glu Lys Lys Tyr Ala Asn Glu Thr Val Asn Pro Tyr Leu	1752
	530 535 540	
55	ATC ATC AAA TGT GGA AAG GAG GAA GTC CGT TCC CCT GTC CAG AAG AAT Ile Ile Lys Cys Gly Lys Glu Glu Val Arg Ser Pro Val Gln Lys Asn	1800
	545 550 555	
60	ACT GTG CAT GCC ATT TTT GAC ACG CAG GCC GTT TTC TAC AGA AGG ACC Thr Val His Ala Ile Phe Asp Thr Gln Ala Val Phe Tyr Arg Arg Thr	1848
	560 565 570	
65	ACT GAC ATT CCT ATT ATC ATC CAG GTG TGG AAC AGC AGA AAA TTC TGT Thr Asp Ile Pro Ile Ile Ile Gln Val Trp Asn Ser Arg Lys Phe Cys	1896
	575 580 585	

DE 197 37 105 A 1

GAT CAG TTC CTG GGG CAG GTT ACT CTC GAT GCT GAC CCC AGC GAC TGC 1944
 Asp Gln Phe Leu Gly Gln Val Thr Leu Asp Ala Asp Pro Ser Asp Cys
 590 595 600 605

CGT GAT CTG AAA TCT CTG TAC CTG CGT AAG AAG GGT GGT CCT ACT GCC 1992
 Arg Asp Leu Lys Ser Leu Tyr Leu Arg Lys Lys Gly Gly Pro Thr Ala
 610 615 620

AAA GTC AAG CAA GGT CAC ATC AGC TTC AAA GTT ATC TCT AGC GAT GAT 2040
 Lys Val Lys Gln Gly His Ile Ser Phe Lys Val Ile Ser Ser Asp Asp
 625 630 635

CTC ACT GAG CTC TAAGTAGTCA TCATCAG 2069
 Leu Thr Glu Leu
 640

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 641 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Gly Pro Pro Leu Lys Leu Phe Lys Asn Gln Lys Tyr Gln Glu Leu
 1 5 10 15

Lys Gln Glu Cys Met Lys Asp Gly Arg Leu Phe Cys Asp Pro Thr Phe
 20 25 30

Leu Pro Glu Asn Asp Ser Leu Phe Phe Asn Arg Leu Leu Pro Gly Lys
 35 40 45

Val Val Trp Lys Arg Pro Gln Asp Ile Ser Asp Asp Pro His Leu Ile
 50 55 60

Val Gly Asn Ile Ser Asn His Gln Leu Ile Gln Gly Arg Leu Gly Asn
 65 70 75 80

Lys Ala Met Ile Ser Ala Phe Ser Cys Leu Ala Val Gln Glu Ser His
 85 90 95

Trp Thr Lys Ala Ile Pro Asn His Lys Asp Gln Glu Trp Asp Pro Arg
 100 105 110

Lys Pro Glu Lys Tyr Ala Gly Ile Phe His Phe Arg Phe Trp His Phe
 115 120 125

Gly Glu Trp Thr Glu Val Val Ile Asp Asp Leu Leu Pro Thr Ile Asn
 130 135 140

DE 197 37 105 A 1

Gly Asp Leu Val Phe Ser Phe Ser Thr Ser Met Asn Glu Phe Trp Asn
 145 150 155 160
 5 Ala Leu Leu Glu Lys Ala Tyr Ala Lys Leu Leu Gly Cys Tyr Glu Ala
 165 170 175
 10 Leu Asp Gly Leu Thr Ile Thr Asp Ile Ile Met Asp Phe Thr Gly Thr
 180 185 190
 15 Leu Ala Glu Ile Ile Asp Met Gln Lys Gly Arg Tyr Thr Asp Leu Val
 195 200 205
 Glu Glu Lys Tyr Lys Leu Phe Gly Glu Leu Tyr Lys Thr Phe Thr Lys
 210 215 220
 20 Gly Gly Leu Ile Cys Cys Ser Ile Glu Ser Pro Ser Gln Glu Glu Gln
 225 230 235 240
 25 Glu Val Glu Thr Asp Trp Gly Leu Leu Lys Gly Tyr Thr Tyr Thr Met
 245 250 255
 Thr Asp Ile Arg Lys Leu Arg Leu Gly Glu Arg Leu Val Glu Val Phe
 260 265 270
 30 Ser Thr Glu Lys Leu Tyr Met Val Arg Leu Arg Asn Pro Leu Gly Arg
 275 280 285
 35 Gln Glu Trp Ser Gly Pro Trp Ser Glu Ile Ser Glu Glu Trp Gln Gln
 290 295 300
 Leu Thr Val Thr Asp Arg Lys Asn Leu Gly Leu Val Met Ser Asp Asp
 305 310 315 320
 Gly Glu Phe Trp Met Ser Leu Glu Asp Phe Cys His Asn Phe His Lys
 325 330 335
 45 Leu Asn Val Cys Arg Asn Val Asn Asn Pro Val Phe Gly Arg Lys Glu
 340 345 350
 50 Leu Glu Ser Val Val Gly Cys Trp Thr Val Asp Asp Asp Pro Leu Met
 355 360 365
 Asn Arg Ser Gly Gly Cys Tyr Asn Asn Arg Asp Thr Phe Leu Gln Asn
 370 375 380
 55 Pro Gln Tyr Ile Phe Thr Val Pro Glu Asp Gly His Lys Val Ile Met
 385 390 395 400
 60 Ser Leu Gln Gln Lys Asp Leu Arg Thr Tyr Arg Arg Met Gly Arg Pro
 405 410 415
 65 Asp Asn Tyr Ile Ile Gly Phe Glu Leu Phe Lys Val Glu Met Asn Arg
 420 425 430

DE 197 37 105 A 1

Arg Phe Arg Leu His His Leu Tyr Ile Gln Glu Arg Ala Gly Thr Ser	
435 440 445	
Thr Tyr Ile Asp Thr Arg Thr Val Phe Leu Ser Lys Tyr Leu Lys Lys	5
450 455 460	
Gly Ser Tyr Val Leu Val Pro Thr Met Phe Gln His Gly Arg Thr Ser	10
465 470 475 480	
Glu Phe Leu Leu Arg Ile Phe Ser Glu Val Pro Val Gln Leu Arg Glu	
485 490 495	15
Leu Thr Leu Asp Met Pro Lys Met Ser Cys Trp Asn Leu Ala Arg Gly	
500 505 510	
Tyr Pro Lys Val Val Thr Gln Ile Thr Val His Ser Ala Glu Gly Leu	20
515 520 525	
Glu Lys Lys Tyr Ala Asn Glu Thr Val Asn Pro Tyr Leu Ile Ile Lys	25
530 535 540	
Cys Gly Lys Glu Glu Val Arg Ser Pro Val Gln Lys Asn Thr Val His	
545 550 555 560	30
Ala Ile Phe Asp Thr Gln Ala Val Phe Tyr Arg Arg Thr Thr Asp Ile	
565 570 575	
Pro Ile Ile Ile Gln Val Trp Asn Ser Arg Lys Phe Cys Asp Gln Phe	35
580 585 590	
Leu Gly Gln Val Thr Leu Asp Ala Asp Pro Ser Asp Cys Arg Asp Leu	40
595 600 605	
Lys Ser Leu Tyr Leu Arg Lys Lys Gly Gly Pro Thr Ala Lys Val Lys	
610 615 620	45
Gln Gly His Ile Ser Phe Lys Val Ile Ser Ser Asp Asp Leu Thr Glu	
625 630 635 640	
Leu	50

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1125 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Homo sapiens

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) CLON: CAPN6

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 2..1125

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

G CTT GTT GAG GAG AAG TAC AAG CTA TTC GGA GAA CTG TAC AAA ACA 46
 Leu Val Glu Glu Lys Tyr Lys Leu Phe Gly Glu Leu Tyr Lys Thr
 1 5 10 15

TTT ACC AAA GGT GGT CTG ATC TGC TGT TCC ATT GAG TCT CCC AAT CAG 94
 Phe Thr Lys Gly Gly Leu Ile Cys Cys Ser Ile Glu Ser Pro Asn Gln
 20 25 30

GAG GAG CAA GAA GTT GAA ACT GAT TGG GGT CTG CTG AAG GGC CAT ACC 142
 Glu Glu Gln Glu Val Glu Thr Asp Trp Gly Leu Leu Lys Gly His Thr
 35 40 45

TAT ACC ATG ACT GAT ATT CGC AAA ATT CGT CTT GGA GAG AGA CTT GTG 190
 Tyr Thr Met Thr Asp Ile Arg Lys Ile Arg Leu Gly Glu Arg Leu Val
 50 55 60

GAA GTC TTC AGT GCT GAG AAG CTG TAT ATG GTT CGC CTG AGA AAC CCC 238
 Glu Val Phe Ser Ala Glu Lys Leu Tyr Met Val Arg Leu Arg Asn Pro
 65 70 75

TTG GGA AGA CAG GAA TGG AGT GGC CCC TGG AGT GAA ATT TCT GAA GAG 286
 Leu Gly Arg Gln Glu Trp Ser Gly Pro Trp Ser Glu Ile Ser Glu Glu
 80 85 90 95

TGG CAG CAA CTG ACT GCA TCA GAT CGC AAG AAC CTG GGG CTT GTT ATG 334
 Trp Gln Gln Leu Thr Ala Ser Asp Arg Lys Asn Leu Gly Leu Val Met
 100 105 110

TCT GAT GAT GGA GAG TTT TGG ATG AGC TTG GAG GAC TTT TGC CGC AAC 382
 Ser Asp Asp Gly Glu Phe Trp Met Ser Leu Glu Asp Phe Cys Arg Asn
 115 120 125

TTT CAC AAA CTG AAT GTC TGC CGC AAT GTG AAC AAC CCT ATT TTT GGC 430
 Phe His Lys Leu Asn Val Cys Arg Asn Val Asn Asn Pro Ile Phe Gly
 130 135 140

CGA AAG GAG CTG GAA TCG GTG TTG GGA TGC TGG ACT GTG GAT GAT GAT 478
 Arg Lys Glu Leu Glu Ser Val Leu Gly Cys Trp Thr Val Asp Asp Asp
 145 150 155

DE 197 37 105 A 1

CCC CTG ATG AAC CGC TCA GGA GGC TGC TAT AAC AAC CGT GAT ACC TTC	526	
Pro Leu Met Asn Arg Ser Gly Gly Cys Tyr Asn Asn Arg Asp Thr Phe		
160 165 170 175		5
CTG CAG AAT CCC CAG TAC ATC TTC ACT GTG CCT GAG GAT GGG CAC AAG	574	
Leu Gln Asn Pro Gln Tyr Ile Phe Thr Val Pro Glu Asp Gly His Lys		
180 185 190		10
GTC ATT ATG TCA CTG CAG CAG AAG GAC CTG CGC ACT TAC CGC CGA ATG	622	
Val Ile Met Ser Leu Gln Gln Lys Asp Leu Arg Thr Tyr Arg Arg Met		
195 200 205		15
GGA AGA CCT GAC AAT TAC ATC ATT GGC TTT GAG CTC TTC AAG GTG GAG	670	
Gly Arg Pro Asp Asn Tyr Ile Ile Gly Phe Glu Leu Phe Lys Val Glu		
210 215 220		20
ATG AAC CGC AAA TTC CGC CTC CAC CAC CTC TAC ATC CAG GAG CGT GCT	718	
Met Asn Arg Lys Phe Arg Leu His His Leu Tyr Ile Gln Glu Arg Ala		
225 230 235		25
GGG ACT TCC ACC TAT ATT GAC ACC CGC ACA GTG TTT CTG AGC AAG TAC	766	
Gly Thr Ser Thr Tyr Ile Asp Thr Arg Thr Val Phe Leu Ser Lys Tyr		
240 245 250 255		30
CTG AAG AAG GGC AAC TAT GTG CTT GTC CCA ACC ATG TTC CAG CAT GGT	814	
Leu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Leu Val Pro Thr Met Phe Gln His Gly		
260 265 270		35
CGC ACC AGC GAG TTT CTC CTG AGA ATC TTC TCT GAA GTG CCT GTC CAG	862	
Arg Thr Ser Glu Phe Leu Leu Arg Ile Phe Ser Glu Val Pro Val Gln		
275 280 285		40
CTC AGG GAA CTG ACT CTG GAC ATG CCC AAA ATG TCC TGC TGG AAC CTG	910	
Leu Arg Glu Leu Thr Leu Asp Met Pro Lys Met Ser Cys Trp Asn Leu		
290 295 300		45
GCT CGT GGC TAC CCG AAA GTA GTT ACT CAG ATC ACT GTT CAC AGT GCT	958	
Ala Arg Gly Tyr Pro Lys Val Val Thr Gln Ile Thr Val His Ser Ala		
305 310 315		50
GAG GAC CTG GAG AGG AGG TAT GCC AAT GGA ACT GTA AAC CCA TAT TTG	1006	
Glu Asp Leu Glu Arg Arg Tyr Ala Asn Gly Thr Val Asn Pro Tyr Leu		
320 325 330 335		55
GTC ATC AAA TGT GGA AAG GAG GAA GTC CGT TCT CCT GTC CAG AAA AAT	1054	
Val Ile Lys Cys Gly Lys Glu Glu Val Arg Ser Pro Val Gln Lys Asn		
340 345 350		60
ACA GTT CAT GCC ATT TTT GAC ACC CAT GCC ATT TTC TAC AGA AGG ACC	1102	
Thr Val His Ala Ile Phe Asp Thr His Ala Ile Phe Tyr Arg Arg Thr		
355 360 365		65

ACG GAC ATT CCT ATT ATA GTA CA
 Thr Asp Ile Pro Ile Ile Val
 370

1125

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 374 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Leu Val Glu Glu Lys Tyr Lys Leu Phe Gly Glu Leu Tyr Lys Thr Phe
 1 5 10 15

Thr Lys Gly Gly Leu Ile Cys Cys Ser Ile Glu Ser Pro Asn Gln Glu
 20 25 30

Glu Gln Glu Val Glu Thr Asp Trp Gly Leu Leu Lys Gly His Thr Tyr
 35 40 45

Thr Met Thr Asp Ile Arg Lys Ile Arg Leu Gly Glu Arg Leu Val Glu
 50 55 60

Val Phe Ser Ala Glu Lys Leu Tyr Met Val Arg Leu Arg Asn Pro Leu
 65 70 75 80

Gly Arg Gln Glu Trp Ser Gly Pro Trp Ser Glu Ile Ser Glu Glu Trp
 85 90 95

Gln Gln Leu Thr Ala Ser Asp Arg Lys Asn Leu Gly Leu Val Met Ser
 100 105 110

Asp Asp Gly Glu Phe Trp Met Ser Leu Glu Asp Phe Cys Arg Asn Phe
 115 120 125

His Lys Leu Asn Val Cys Arg Asn Val Asn Asn Pro Ile Phe Gly Arg
 130 135 140

Lys Glu Leu Glu Ser Val Leu Gly Cys Trp Thr Val Asp Asp Asp Pro
 145 150 155 160

Leu Met Asn Arg Ser Gly Gly Cys Tyr Asn Asn Arg Asp Thr Phe Leu
 165 170 175

Gln Asn Pro Gln Tyr Ile Phe Thr Val Pro Glu Asp Gly His Lys Val
 180 185 190

Ile Met Ser Leu Gln Gln Lys Asp Leu Arg Thr Tyr Arg Arg Met Gly
 195 200 205

Arg	Pro	Asp	Asn	Tyr	Ile	Ile	Gly	Phe	Glu	Leu	Phe	Lys	Val	Glu	Met	
210						215					220					
Asn	Arg	Lys	Phe	Arg	Leu	His	His	Leu	Tyr	Ile	Gln	Glu	Arg	Ala	Gly	5
225					230				235						240	
Thr	Ser	Thr	Tyr	Ile	Asp	Thr	Arg	Thr	Val	Phe	Leu	Ser	Lys	Tyr	Leu	10
				245					250					255		
Lys	Lys	Gly	Asn	Tyr	Val	Leu	Val	Pro	Thr	Met	Phe	Gln	His	Gly	Arg	
			260					265					270			15
Thr	Ser	Glu	Phe	Leu	Leu	Arg	Ile	Phe	Ser	Glu	Val	Pro	Val	Gln	Leu	
		275					280					285				
Arg	Glu	Leu	Thr	Leu	Asp	Met	Pro	Lys	Met	Ser	Cys	Trp	Asn	Leu	Ala	20
		290				295					300					
Arg	Gly	Tyr	Pro	Lys	Val	Val	Thr	Gln	Ile	Thr	Val	His	Ser	Ala	Glu	
305					310				315						320	25
Asp	Leu	Glu	Arg	Arg	Tyr	Ala	Asn	Gly	Thr	Val	Asn	Pro	Tyr	Leu	Val	
				325					330					335		30
Ile	Lys	Cys	Gly	Lys	Glu	Glu	Val	Arg	Ser	Pro	Val	Gln	Lys	Asn	Thr	
			340					345					350			
Val	His	Ala	Ile	Phe	Asp	Thr	His	Ala	Ile	Phe	Tyr	Arg	Arg	Thr	Thr	35
		355					360					365				
Asp	Ile	Pro	Ile	Ile	Val											40
			370													

Patentansprüche

1. CAPN6-Calpaingen mit der Sequenz SEQ ID NO. 1 oder SEQ ID NO. 3, seine allelischen Varianten, Analoge oder Derivate, die auf der abgeleiteten Aminosäureebene eine Homologie von 60 bis 100% aufweisen, wobei die Calpaingene, ihre allelischen Varianten, Analoge oder Derivate folgende Sequenzen enthalten:
 - (a) Leu-Gly-Asn-Lys-Ala,
wobei sich diese Sequenz von der entsprechenden Sequenz im humanen Calpain I dadurch unterscheidet, daß die Aminosäure Cystein im humanen Calpain I, die die Position 115 im Calpain I besitzt, gegen Lysin, das an Position 81 der Sequenzen SEQ ID No. 1 und SEQ ID No. 3 liegt, verändert ist; 50
 - (b) Ala-X-Ser-Cys-Leu-Ala,
wobei gegenüber der entsprechenden Sequenz im humanen Calpain I die Aminosäuren Alanin und Threonin in den Positionen 122 und 125 gegen Serin und Alanin in den Positionen 88 und 91 in den Sequenzen SEQ ID No. 1 und SEQ ID No. 3 verändert sind; 55
 - (c) Gly-Tyr-Thr-(His oder Tyr)-Thr-X-Thr,
wobei gegenüber der entsprechenden Sequenz im humanen Calpain I die Aminosäuren Histidin, Alanin und Serin in den Positionen 272, 273 und 275 gegen Tyrosin, Threonin und Threonin in den Positionen 252, 253 und 255 in den Sequenzen SEQ ID No. 1 und SEQ ID No. 3 verändert sind und in der SEQ ID No. 3 zusätzlich der Tyrosinrest in Position 274 im Calpain I gegen Histidin in Position 254 in der SEQ ID No. 3 verändert ist; 60
 - (d) Arg-X-Arg-Asn-Pro-Leu-Gly
wobei sich diese Sequenz von der entsprechenden Sequenz im humanen Calpain I dadurch unterscheidet, daß die Aminosäure Tryptophan im humanen Calpain I, die die Position 298 im Calpain I besitzt, gegen Leucin, das an Position 286 der Sequenzen SEQ ID No. 1 und SEQ ID No. 3 liegt, verändert ist und X in den genannten Sequenzen eine beliebige natürliche Aminosäure bedeutet. 65
2. Genkonstrukt enthaltend ein CAPN6-Calpaingen, seine allelischen Varianten oder Analoge gemäß Anspruch 1, das funktionell mit einem oder mehreren Regulationssignalen zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft ist.

3. Aminosäuresequenzen codiert durch CAPN6-Gene, allelischen Varianten oder Analoge gemäß Anspruch 1.
4. Aminosäuresequenzen nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um enzymatisch aktive Proteine handelt.
5. Verfahren zur Identifizierung von Calpaininhibitoren, wobei man ein Calpain, seine allelischen Varianten oder Analoge codiert durch eine Sequenz gemäß Anspruch 1 aus Geweben oder Zellen isoliert und die Inhibierung der Spaltung eines Substrats des Enzyms CAPN6 und in mindestens einem weiteren Test die Inhibierung der Spaltung eines Substrats der Enzyme Calpain I und/oder II durch Testsubstanzen mißt und die Testsubstanzen auswählt, die das Enzym CAPN6 und mindestens ein weiteres der Calpaine hemmen.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man die Testsubstanzen auswählt, die das Enzym CAPN6 nicht hemmen, jedoch die Enzyme Calpain I und/oder II.
7. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man die Testsubstanzen auswählt, die das Enzym CAPN6 hemmen, nicht jedoch die Enzyme Calpain I und/oder II.
8. Verfahren nach den Ansprüchen 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß man die Testsubstanzen auswählt, die in zellulären Systemen die Zellmembran passieren.
9. Verfahren zur Herstellung des Enzyms CAPN6 sowie seiner allelischen Varianten oder Analoge, dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine Kopie der Gensequenzen für CAPN6, seine allelischen Varianten oder Analoge gemäß Anspruch 1 in einen Vektor kloniert und in einem dem Vektor entsprechenden Wirtsorganismus das Gen für das Enzym CAPN6, seine allelischen Varianten oder Analoge exprimiert und anschließend das Enzym aus dem Wirtsorganismus isoliert.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man einen Vektor verwendet der in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen die Expression der Gene, der allelischen Varianten oder Analoge ermöglicht.
11. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man als Wirtsorganismus Bakterien, pilzliche oder tierische Zellen verwendet.
12. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man als Vektor Baculoviren und als Wirtsorganismus Insektenzellen verwendet.
13. Verwendung eines Calpaininhibitors identifizierbar gemäß den Ansprüchen 5 bis 8 zur Herstellung von Medikamenten zur Behandlung von Krankheiten bei denen eine Calpainfehlfunktion vorliegt.
14. Verwendung eines Calpaininhibitors nach Anspruch 13 zur Herstellung von Medikamenten zur Behandlung von Krankheiten ausgewählt aus der Gruppe der kardiovaskulären, immunologischen, entzündlichen, allergischen, neurologischen, neurodegenerativen oder onkologischen Erkrankungen.
15. Verwendung einer Aminosäuresequenz gemäß Anspruch 3 in Testsystemen.
16. Verwendung einer Aminosäuresequenz gemäß Anspruch 3 zur Herstellung von Antikörpern.
17. Verwendung einer Gensequenz, seiner allelischen Varianten oder Analoge gemäß Anspruch 1 zur Herstellung von antisense mRNA.
18. Verwendung der antisense mRNA nach Anspruch 17 zur Herstellung von Medikamenten zur Behandlung von Krankheiten bei denen eine Calpainfehlfunktion vorliegt.
19. Verwendung eines Calpaingens sowie seiner allelischen Varianten oder Analoge gemäß Anspruch 1 zur Diagnose von Krankheiten oder in der Gentherapie.

Hierzu 10 Seite(n) Zeichnungen

Page 1

[illegible]

	80	90	100	110	120	130	140
	QDYEQLRNECLEAGVLFQDPSPFPDPSSGLGFSELGPISSSKTRGIVWKRPTTEICENPQFIIGGAT						
CAN1_HUMAN	QDYEQLRVRCQSGTLFRDEAFPPVPQSLGYKDLGNSSKTYGIKWKRPTELLSNPQFIVDGT						103
CAN2_HUMAN	QDYEQLRNECLEAGTLFQDPSPFPAIPALGFKELGYPYSSKTRGWRWKRPTEICADPQFIIGGAT						93
CAN2_RAT	QDYETLRNECLEAGALFQDPSPFPAIPSSLGFKELGPYSSKTRGIEWKRPTEICADPQFIIGGAT						93
CAN3_HUMAN	KTFEQLHKKCKLEKVLVVDPEFPDETSIFYSQKFPQI-----FVWKRPPEICEINPRFIIIDGAN						117
CAN3_RAT	KTFEQLHKKCKLEKVLVLDPEFPDETSIFYSQKFPQI-----FVWKRPPEICEINPRFIIIGGAN						117
DMCLPNOCM_1	GPYSEVQDYETILNSCLASGLSFEDPLFPASNESLQFS-----RRPDRHIEWLRPHEIAENPQFFVEGYS						131
cpn6 translat	QYQELKQECMKDGRFLCDPTFLPNDLSLFNRLLPKG-----VVKRPQDISDDPHLIVGNIS						69

[illegible]

Figur 1

CAN1_HUMAN	220	230	240	250	260	270	280
CAN2_HUMAN	233						
CAN2_RAT	223						
CAN3_HUMAN	223						
CAN3_RAT	247						
DMCLPNOCM_1	247						
cpn6 transl	261						
cpn6 transl	209						
CAN1_HUMAN	290	300	310	320	330	340	350
CAN2_HUMAN	263						
CAN2_RAT	253						
CAN3_HUMAN	253						
CAN3_RAT	313						
DMCLPNOCM_1	313						
cpn6 transl	296						
cpn6 transl	247						
CAN1_HUMAN	360	370	380	390	400	410	420
CAN2_HUMAN	312						
CAN2_RAT	302						
CAN3_HUMAN	302						
CAN3_RAT	374						
DMCLPNOCM_1	374						
cpn6 transl	344						
cpn6 transl	300						

Figur 1

	430	440	450	460	470	480	490	
	EWNTVDP	PEERARL	GLQV--	EDGEFWMSF	SDFLRHFT	RLLEIC--	NLTPDAL	TSDTL----
	QKWT	VS	VNEGN	NR				
CAN1_HUMAN	EMNNVDP	PYERDQ	LRVKM--	EDGEFWMSF	RDQFMRE	FTRLLEIC--	NLTPDAL	KSRTY----
CAN2_HUMAN	SWNTID	PEERERL	TRRH--	EDGEFWMSF	SDFLRHYS	RLLEIC--	NLTPDYL	TSDTY----
CAN2_RAT	SWNTVDP	EVANLTER	Q--	EDGEFWMSF	SDFLRHYS	RLLEIC--	NLTPDYL	TSDSY----
CAN3_HUMAN	DWSFVD	KDEKARL	QHQT	VEDGEFWMSY	EDFYHFT	TKLEIC--	NLTADAL	QSDKL----
CAN3_RAT	DWSFVD	KDEKARL	QHQT	VEDGEFWMSY	DDFYHFT	TKLEIC--	NLTADAL	ESDKL----
DMCLPNOCM_1	EMRYI	PEEQKAE	IGLTF	DRDGEFWMSF	QDFLNHF	DRVEIC--	NLSPDSL	TEDQONS
cpn6 translat	EWQQL	ITVTD	RKNLGL	VMSDDGEFWMSL	EDFCHN	FHKLNV	CRNVN	NVNFVGRK
	EL	ES	VV	GC	WT	VD--	DD	PLM
	376	366	366	439	439	413	368	
	RGSTAGG	CRNFP	PDFT	FWTN	PQYL	LKLEED	DDDE	GDGS--
	GC	SFL	VAL	MQ	KNR	RRDR	KMGA--	DMHTIG
	FAL							
CAN1_HUMAN	RGSTAGG	CRNYP	ATFW	NPQK	IRLDE	ITD	DDPY	GDRES
CAN2_HUMAN	RGSTAGG	CRNYP	NTFW	NPQYL	IKLEE	DEDE	DEDE	GES--
CAN2_RAT	RGSTAGG	CRNYP	NTFW	NPQYL	IKLEE	DEDE	DEDE	GER--
CAN3_HUMAN	RGCSAGG	CRNFP	PDFT	FWTN	PQYRL	KLEE	DDDPD--	DSEVIC
CAN3_RAT	RGCSAGG	CRNFP	PDFT	FWTN	PQYRL	KLEE	DDDPD--	DSEVIC
DMCLPNOCM_1	PGVTAGG	CRNFL	DTFW	HN	PQYI	ITL	VPD	DEDE
cpn6 translat	N--	RS	GGC	YNNR	DT	FL	QNPQ	YITV-----
	PED	G	H	K-----				
	VEVPEEL	HGNT	NIHL	SKD	FFLY	NAS	RARS	DTFINL
	REV	SNR	FKL	PP	GEX	VL	VP	STFEP
	KEGE	FI	LR	VFS				
CAN1_HUMAN	YEVPP	ELVG	QPA	VHL	KRD	FFL	AN	SAR
CAN2_HUMAN	YEVPEEL	SGQ	TNIHL	SKN	FFLT	NR	AR	ERS
CAN2_RAT	YEVPEEL	TGQ	TNIHL	SKN	FFLT	NR	AR	ERS
CAN3_HUMAN	YEVPK	EMHGN	KQ--	HLQ	KD	FFL	YN	AS
CAN3_RAT	YEVPK	EMHGN	KQ--	HLQ	KD	FFL	YN	AS
DMCLPNOCM_1	YSLN	DRE	LEN	RPQ	GL--	NFF	RYK	SV
cpn6 translat	FK	VEM----	NR	R	L	H	---	LYI
	Q	ER	AG	T	S	T	Y	I
	D	T	R	I	V	F	L	S
	K	L	K	G	S	V	L	V
	P	T	M	F	Q	H	R	T
	S	E	F	L	L	R	I	F
	S							
	515	503	503	575	575	546	488	

Figur 1

	640	650	660	670	680	690	700	
EKKALSEEVDTTISANLP				EKEL-VEEED	DEG--KT			
CAN1_HUMAN	EKSAGIVELDDQIQANLP			DEQVLSEEEIDEN				547
CAN2_HUMAN	EKKADYQAVDDEIEANLE			EFDI-SEDDIDDG				534
CAN2_RAT	EKKADYQIVDDEIEANIE			EIEA-NEEDIGDG				534
CAN3_HUMAN	EKRNLSEEVENTISVDRPVKKKTKPIIFVSDRANSNKKELGVDQSEEEGKGTSPDKQKQSPQPGSSD							645
CAN3_RAT	EKRNLSEEAENTISVDRPVKKKKNKPIIFVSDRANSNKKELGVDQEAEEGKDKTGPDKGESQP RP PGHTD							645
DMCLPNOCM_1	E			TQNNMERISRQ				558
cpn6 transl	EVFVQLRELTLDMP		KMSCWNLARGYPKVVTQITVHSAEGLKCKYANEIVNP					540
	710	720	730	740	750	760	770	
FRNLFAQLAGEDMEISADELKTILNRVVAKHKDLKTGDFSLESCRSVMALMDTDGSGKGLQ								
CAN1_HUMAN	FKALFRQLAGEDMEISVKELRTILNRIISKHKDLRTKGFLESRCRSMVNLMDRDGNGKGLV							608
CAN2_HUMAN	VRRLFAQLAGEDAEISAFELQTLIRRVLAQRQDKSDGFSIETCKIMVMDLSDSGSKGLK							595
CAN2_RAT	FRLFAQLAGEDAEISAFELQTLIRRVLAQRQDKSDGFSIETCKIMVMDLDEGSGKGLK							595
CAN3_HUMAN	QSEEQQFRNIFKQIAGDDMEICADELKKVLTNVNKHDKLTKHGTILESRCRSMIALMDTDGSGKLNQ							715
CAN3_RAT	QSEEQQFRNIFRQIAGDDMEICADELKNVLTNVNKHDKLTKIQGTILESRCRSMIALMDTDGSGRLNQ							715
DMCLPNOCM_1								558
cpn6 transl	YLIKCGKEEVRSPVQKNVTVHAIFDIQAVF			YRRIT				577
	780	790	800	810	820	830	840	
EFHLLWNKIKAYQKIFREIDVDRSGTMSYEMRNAVEDAGFKLNCQLYDIVARYADDHLIIDFDNFVCC								
CAN1_HUMAN	EFNILWNRIRNYLSIFRKFDDKSGMSAYEMRMAIESAGFKLNKLYELIITRYSEPD LAVDFNFVCC							678
CAN2_HUMAN	EFYILWTKIQYQKIYREIDVDRSGTMSYEMRKALEEAGFKMPQCHQVIVARFADDQLIIDFDNFVRC							665
CAN2_RAT	EFYILWTKIQYQKIYREIDVDRSGTMSYEMRKALEEAGFKLPCQHQVIVARFADDELIIDFDNFVRC							665
CAN3_HUMAN	EFHHLWNKIKAWQKIFKHDTQDQSGTINSYEMRNAVNDAGFHLNQLYDIITMRYADKHMNIDFDSFICC							785
CAN3_RAT	EFHHLWKKIKAWQKIFKHDTDHSQTINSYEMRNAVNDAGFHLNSQLYDIITMRYADKHMNIDFDSFICC							785
DMCLPNOCM_1								558
cpn6 transl	IIIQVWNSRKFCDDQFLGQVITLDADPDSDCR					DLKSLYLRKKGPTAKVK		625

Figur 1

714
700
700
821
821
558
642

CAN1_HUMAN	LVRLETMFRFFKTLDTDLGVTFTDLFKWLQLTMTFA	850	860	870
CAN2_HUMAN	LVRLETLFKIFKQDPENTGTIELDLISWLCFSVL			
CAN2_RAT	LVRLEILFKIFKQDPENTGTIQDLISWLSFSVL			
CAN3_HUMAN	FVRLEGMFRAFHAFDKDGGIIKLVNLEWLQLTMYA			
CAN3_RAT	FVRLEGMFRAFHAFDKDGGIIKLVNLEWLQLTMYA			
DMCLPNOCM_1				
cpn6 transl	at-----QGHISFKVISDDLTTEL.			

Figur 2

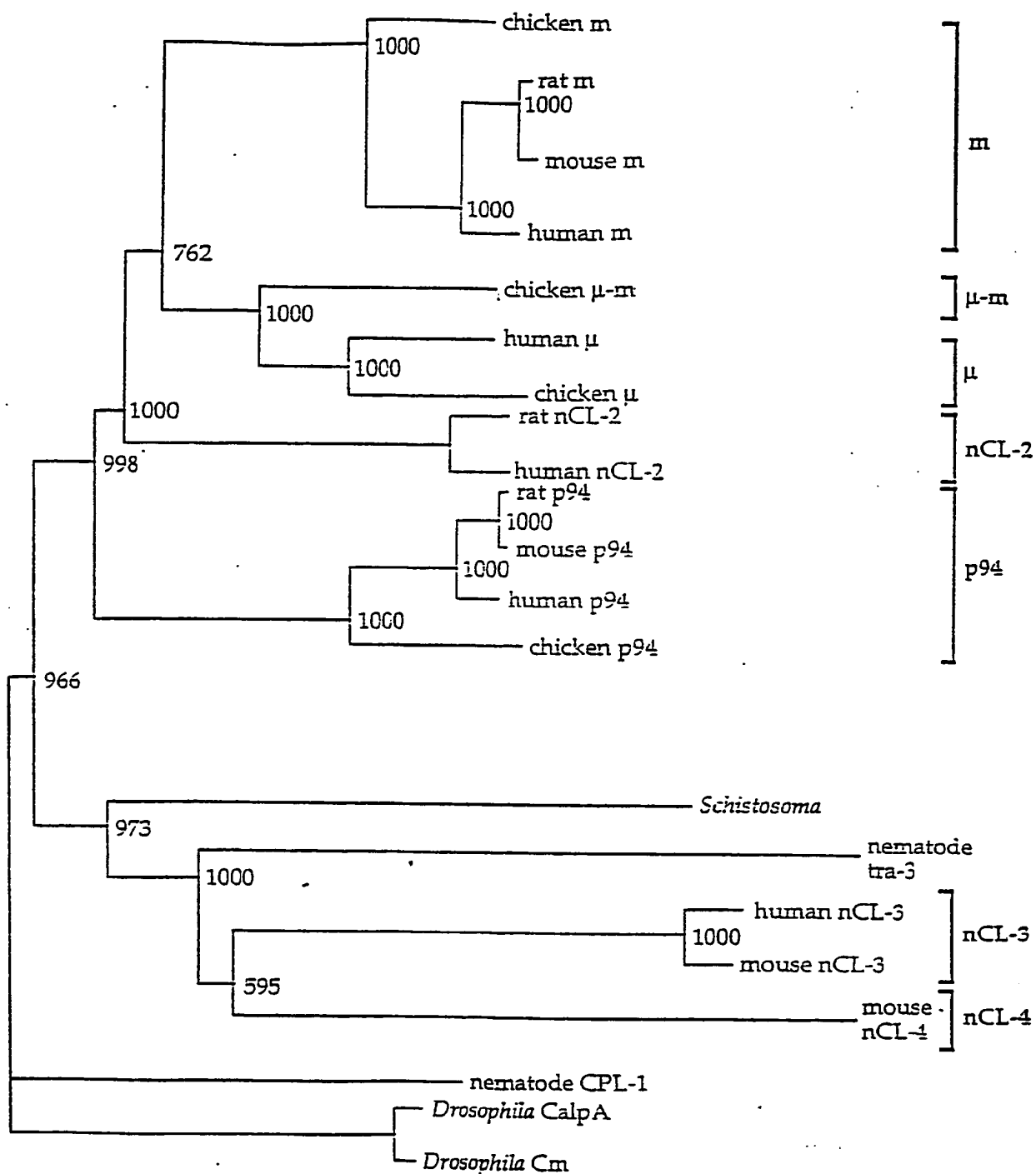
[illegible]

[illegible]

Figur 2

[illegible]

Figur 3



Figur 4

Capn6

1 2 3 4 5 6 7 8

A

B

C

D

E

F

G

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	whole brain	amygdala	caudate nucleus	cerebellum	cerebral cortex	frontal lobe	hippocampus	medulla oblongata
B	occipital lobe	putamen	substantia nigra	temporal lobe	thalamus	sub-thalamic nucleus	spinal cord	
C	heart	aorta	skeletal muscle	colon	bladder	uterus	prostate	stomach
D	testis	ovary	pancreas	pituitary gland	adrenal gland	thyroid gland	salivary gland	mammary gland
E	kidney	liver	small intestine	spleen	thymus	peripheral (leukocyte)	lymph node	bone marrow
F	appendix	lung	trachea	placenta				
G	fetal brain	fetal heart	fetal kidney	fetal liver	fetal spleen	fetal thymus	fetal lung	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)